

Aus dem Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Catechinen und Quercetin beim Rind

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

M.Sc. agr. Birgit Beyer

aus Schwerin

Kiel, 2015

Gedruckt mit der Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Dekan: Prof. Dr. Eberhard Hartung

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Siegfried Wolfram
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Edgar Schallenberger

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2015

Diese Dissertation wurde mit dankenswerter Unterstützung des Bundesministeriums
für Bildung und Forschung angefertigt.

Meinen Kindern.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1 Struktur von Flavonoiden	3
2.2 Vorkommen und Aufnahme von Flavonoiden	5
2.3 Bioverfügbarkeit	7
2.4 Wirkungen und Wirkungspotential.....	13
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Versuchstiere und Rationsgestaltung	19
3.2 Catechinexperimente.....	21
3.2.1 Versuch zur Bioverfügbarkeit von Catechinen (V1)	21
3.2.2 Einfluss der Catechine auf die Gasbildung (V2)	24
3.2.3 Ruminaler Abbau von Catechinen (V3)	26
3.3 Quercetinexperimente	29
3.3.1 Einfluss von Futterfett auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin (V4 + V5).....	29
3.3.2 Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Zwiebelschalenextrakt und Zwiebelextrakt (V6).....	31
3.4 Statistik.....	36
4. Ergebnisse.....	37
4.1 Catechinexperimente.....	37
4.1.1 Versuch zur Bioverfügbarkeit von Catechinen (V1)	37
4.1.2 Ruminaler Abbau von Catechinen (V3)	40
4.1.3 Einfluss von Catechinen auf die Gasbildung (V2)	42
4.2 Quercetinexperimente	43
4.2.1 Einfluss von Futterfett auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin (V4 + V5).....	43
4.2.2 Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Zwiebelschalenextrakt und Zwiebelextrakt (V6).....	47

5. Diskussion	49
6. Zusammenfassung.....	63
7. Summary.....	65
8. Literatur.....	67
Anhang A.....	VI
Anhang B.....	IX
Danksagung.....	XI
Lebenslauf.....	XII

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Flavonoid-Grundgerüst (Flavan)	3
Abb. 2: Flavonoidunterklassen	3
Abb. 3: Strukturformeln der wichtigsten Flavan-3-ole.....	4
Abb. 4: Strukturformeln ausgewählter Flavonole.....	5
Abb. 5: Mögliche Absorptions- und Metabolisierungsmechanismen ausgewählter polyphenolischer Verbindungen im Dünndarm.	9
Abb. 6: Schematische Darstellung der systemischen Verfügbarkeit von Quercetin (Q), Kaempferol (K) und Catechin (C).....	11
Abb. 7: Versuchsaufbau V1 in dreiarbigem Crossover- Design.	21
Abb. 8: Repräsentative Eichgerade von Catechin.	24
Abb. 9: Repräsentative Eichgerade von Epigallocatechingallat.	28
Abb. 10: Versuchsaufbau V4 in fünfarmigem Crossover- Design.	30
Abb. 11: Versuchsaufbau V5 in dreiarbigem Crossover- Design.	31
Abb. 12: Versuchsdesign V6 in dreiarbigem Crossover- Design.....	32
Abb. 13: Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von Quercetin (Q), Kaempferol, Isorhamnetin (I) und Tamarixetin.	35
Abb. 14: Repräsentative HPLC Chromatogramme einer Plasmaprobe 2,5 h nach intraruminaler Applikation von 50 mg Grüteeextrakt/kg KM (A), derselben mit Standard (1 µmol/l) gespickten Probe (B) sowie des Standards (1 µmol/l, C).	38
Abb. 15: Zeitabhängiger Verlauf der Konzentrationen von Gallocatechin (GC), Epigallocatechin (EGC), Epicatechin (EC) und Epigallocatechin- gallat (EGCG) im Inkubationsmedium.	41
Abb. 16: Zeitverlauf der kumulativen Gasbildung ohne (Kontrolle) bzw. mit Zusatz von 20 oder 40 mg Grüteeextrakt (GTE)/l durch Inkubation in Milchleistungsfutter (MLF, A) und Heu (B).	42
Abb. 17: Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM aus verschiedenen Quercetinquellen.	44
Abb. 18: Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von 20 mg Quercetinäquivalenten/kg KM aus verschiedenen Quercetinquellen.	46
Abb. 19: Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM aus verschiedenen Quercetinquellen.	48

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Flavonoid-Gehalte ausgewählter Futtermittel.....	6
Tab. 2: Rohnährstoffgehalte des für die Versuchsrationen verwendeten Milchleistungsfutters und Heus in % der Trockenmasse (TM).....	20
Tab. 3: Catechinzusammensetzung des Grünteeextrakts Polyphenon 60	22
Tab. 4: Verlauf des Elutionsgradienten bei der HPLC- Bestimmung von Catechinen aus dem Plasma	23
Tab. 5: Verlauf des Elutionsgradienten bei der HPLC- Bestimmung von Catechinen aus Pansensaft	27
Tab. 6: Quercetingehalte im Zwiebel-und Zwiebelschalenextrakt.....	32
Tab. 7: Retentionszeiten und Peak-Flächen der detektierten Peaks ^{*)} einer Plasmaprobe 2,5 h nach intraruminaler Applikation von 50 mg Grünteeextrakt/kg KM (A), derselben mit Standard (1 µmol/l Plasma) gespikten Probe (B) sowie des Standards (1 µmol/l Plasma, C)	39
Tab. 8: Pharmakokinetische Parameter nach intraruminaler Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM als Quercetin-Aglycon (Q), Quercetin-angereicherte Fettpellets (QPel), Q + Quercetin-freies Fettpulver (Q + FP), Rutin (R) sowie ohne Quercetin-Zusatz (K).....	44
Tab. 9: Pharmakokinetische Parameter nach intraruminaler Applikation von 20 mg Quercetinäquivalenten/kg KM als Rutin (R), Quercetin-angereicherte Fettpellets (QPel) und Quercetin-angereichertes Fettpulver (QFP)	46
Tab. 10: Pharmakokinetische Parameter nach intraruminaler Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM als Rutin (R), Quercetin (Q), Zwiebelschalenextrakt (ZSE) und Zwiebelextrakt (ZE)	48
Tab. B1: Zusammensetzung des Milchleistungsfutters 18/3.....	IX
Tab. B1: Zusammensetzung des Mineralfutters (Panto® –Mineral R62, Hamburger Leistungsfutter GmbH, Hamburg, Deutschland)	IX
Tab. B3: Zusammensetzung des Inkubationsmediums im Hohenheimer Futterwerttest	X

Abkürzungsverzeichnis

ADF	Saure Detergenzienfaser (<u>a</u> cid <u>d</u> etergent <u>f</u> iber)
ADL	Saures Detergenzienlignin (<u>a</u> cid <u>d</u> etergent <u>l</u> ignin)
ANOVA	Varianzanalyse (<u>a</u> nalysis <u>o</u> f <u>v</u> ariance)
AUC	Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve (<u>a</u> rea <u>u</u> nder the <u>c</u> urve)
CBG	Cytosolische β -Glucosidase
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
FM	Frischmasse
GTE	Grünteextrakt
HFT	Hohenheimer Futterwerttest
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
i.r.	intraruminal
KM	Körpermasse
LPH	Lactase-Phlorizin-Hydrolase
MLF	Milchleistungsfutter
NDF	Neutrale Detergenzienfaser (<u>n</u> eu <u>t</u> ral <u>d</u> etergent <u>f</u> iber)
NEFA	nicht-veresterte Fettsäuren (<u>n</u> on- <u>e</u> sterified <u>f</u> atty <u>a</u> cid)
SD	Standardabweichung (<u>s</u> tandard <u>d</u> eviation)
EDTA	<u>E</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etra <u>a</u> cetic disodium salt dihydrate
SEM	Standardfehler (<u>s</u> tandard <u>e</u> rror of the <u>m</u> ean)
SGLT1	Natrium-abhängiger Glucosetransporter 1 (<u>s</u> odium- <u>d</u> ependent glucose transporter 1)
SULT	Sulfotransferasen
TM	Trockenmasse
UGT	Uridin-5'-Diphosphat-Glucuronosyltransferasen
XA	Rohasche
XF	Rohfaser
XL	Rohfett
XP	Rohprotein
ZE	Zwiebelextrakt
ZSE	Zwiebelschalenextrakt

1. Einleitung

Flavonoide gehören zur großen heterogenen Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe und sind natürlicher Weise in unterschiedlichen Konzentrationen in pflanzlichen Futter- und Lebensmitteln enthalten. In zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*- Studien an monogastrischen Spezies wurden positive gesundheitsfördernde Wirkungen (antioxidativ, antiinflammatorisch, bakterizid, etc.) der Flavonoide nachgewiesen, weshalb ihr Einsatz auch bei der hochlaktierenden Milchkuh auf Grund ihrer besonderen metabolischen Stoffwechselsituation post partum von grundsätzlichem Interesse ist. Im Besonderen sind dabei das Flavonol Quercetin sowie die Catechine (Flavan-3-ole) zu nennen, welche unter den Flavonoiden zu den am häufigsten auftretenden und am besten untersuchtesten zählen. Voraussetzung für jegliche Aussagen über postabsorptive Wirkungen von Flavonoiden im Allgemeinen ist allerdings ihre Verfügbarkeit im systemischen Kreislauf. Im Gegensatz zu monogastrischen Spezies, unterliegen Futtermittel im Vormagensystem der Wiederkäuer dem umfangreichen Abbau durch Mikroorganismen, wodurch von einem Einfluss auf die Bioverfügbarkeit sämtlicher oral aufgenommener Substanzen, wie auf die Flavonoide, ausgegangen werden kann. Erste Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit des Flavonols Quercetin beim Rind haben gezeigt, dass im Gegensatz zur monogastrischen Spezies, dass das Quercetin aus dem Glukorhamnosid Rutin wesentlich besser systemisch verfügbar ist, als das zuckerfrei Quercetin-Aglycon. Daraus schlussfolgernd, dass der Zuckerrest des Rutins möglicherweise verantwortlich für die bessere Bioverfügbarkeit von Quercetin beim Rind ist, lag als natürliche Alternative zum Rutin der Einsatz von Quercetin-Mono- und Diglucosid- reichem Zwiebelextrakt nahe. Eine weiterer Ansatz, das Rutin als Quercetin-Quelle beim Rind zu ersetzen, war der Einsatz von sogenanntem „pansengeschütztem“ Quercetin-Aglycon, was in der vorliegenden Studie durch die Integration von freiem Quercetin in ein kommerzielles Futterfett realisiert wurde.

Über die Bioverfügbarkeit der Catechine, welche in großen Mengen in Grüntee enthalten sind, liegen derzeit keine Erkenntnisse vor, doch aus den schon erwähnten Gründen ist auch ihr Einsatz bei hochleistenden Milchrindern von grundsätzlichem Interesse. Des Weiteren ist von Interesse, in wieweit sich antimikrobielle Eigenschaften der Catechine auf die Mikroorganismen im Pansen und damit verbundene symbiotische Prozesse zwischen Wirtstier und den in den Vormägen angesiedelten Mikroben auswirkt. Der Einsatz von Flavonoiden im Hinblick auf positive postabsorptive Wirkungen beim Rind ist nur dann sinnvoll, wenn negative Effekte auf die Fermentation im Pansen ausgeschlossen werden können.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Catechinen aus einem Grünteeextrakt in zwei verschiedenen Dosierungen. Des Weiteren wurde in *in vitro*- Versuchen der Abbau durch Pansenmikroben sowie der Einfluss von Catechinen auf Fermentationsprozesse bestimmt.

Die zweite zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Quellen (Zwiebelextrakt, Zwiebelschalenextrakt, Quercetin-angereichertes Futterfett) nach jeweils einmaliger intraruminaler Applikation beim Rind.

2. Literaturübersicht

2.1 Struktur von Flavonoiden

Flavonoide gehören zur Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe (Polyphenole) und kommen ubiquitär in pflanzlichen Lebens- und Futtermitteln vor. Derzeit wird die Zahl der identifizierten Polyphenole auf mehr als 6000 benannt (HARBORNE & WILLIAMS, 2000), wobei die Flavonoide die größte Gruppe darstellen (BEECHER, 2003). Sie werden in allen höheren Pflanzen aus Phenylalanin und Essigsäure über den Shikimatweg gebildet und dienen unter anderem als Fraßschutz vor Herbivoren. Flavonoide leiten sich strukturell vom Flavan ab, welches aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen (A und B) sowie einem O-heterozyklischen Ring (C) besteht (Abb. 1).

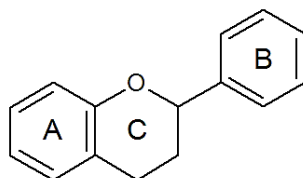


Abb. 1: Flavonoid-Grundgerüst (Flavan)

In Abhängigkeit vom Oxidationsgrad an den Kohlenstoffatomen C-2, -3 und -4 sowie Anzahl und Position der funktionellen Gruppen am Grundgerüst, lassen sich die Flavonoide in 6 Unterklassen einteilen: Flavanole (z.B. Catechin, Galocatechin), Flavanone (z.B. Hesperidin, Naringenin), Flavone (z.B. Luteolin, Apigenin), Flavonole (z.B. Quercetin, Kaempferol), Isoflavone (z.B. Genistein, Daidzein) und Anthocyanidine (z.B. Cyanidin, Malvidin) (BEECHER, 2003, Abb. 2).

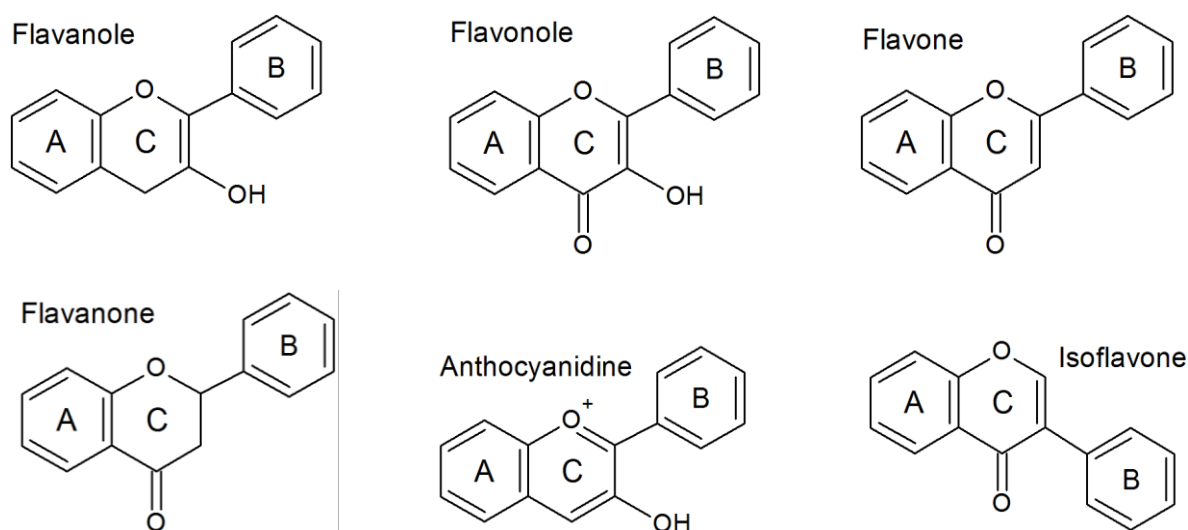
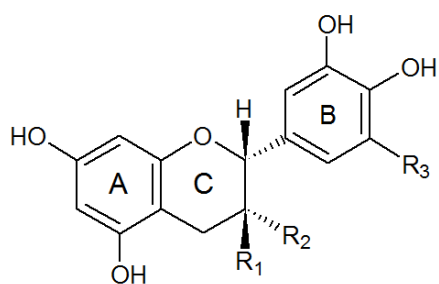


Abb. 2: Flavonoidunterklassen (AHERNE & O'BRIEN, 2002)

Flavan-3-ole (Catechine)

Die Gruppe der Flavan-3-ole umfasst sowohl die monomeren farblosen Catechine, als auch die polymeren Proanthocyanidine, Theaflavine und Thearubigene (ARON & KENNEDY, 2008). Im Gegensatz zu den meisten Flavonoiden, welche in glycosidischer Form in Pflanzen vorliegen, kommen Flavanole hauptsächlich in freier Form oder als Gallussäurekonjugat vor. Catechine besitzen eine zentrale Chiralität und infolge von Epimerisierungsreaktionen am asymmetrischen Kohlenstoffatom kann das Aglycon als (+)- oder (-)-Isomer vorliegen. Die einzelnen Catechine unterscheiden sich in ihrem Hydroxilierungsmuster am B-Ring, ihre wichtigsten Vertreter sind (+)-Catechin (C), (+)-Gallocatechin (GC), (-)-Epicatechin (EC), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechingallat (ECG) und (-)-Epigallocatechingallat (EGCG)(Abb.3).

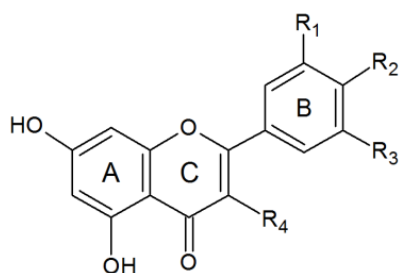


Flavan-3-ol	R1	R2	R3
(+)-Catechin	OH	H	H
(-)-Epicatechin	H	OH	H
(+)-Gallocatechin	OH	H	OH
(-)-Epigallocatechin	H	OH	OH
(-)-Epicatechingallat	H	galloyl	H
(-)-Epigallocatechingallat	H	galloyl	OH

Abb. 3: Strukturformeln der wichtigsten Flavan-3-ole (GRAHAM, 1992)

Flavonole

Flavonole stellen die größte Gruppe der Flavonoide dar, wobei das Flavonol Quercetin (3, 3', 4', 5, 7-Pentahydroxyflavon) auf Grund seines ubiquitären Vorkommens in pflanzlichen Futter- und Lebensmitteln das am häufigsten untersuchte ist (AHERNE & O'BRIEN, 2002). In der Pflanze liegt es fast ausschließlich glycosidisch gebunden vor, wodurch die Polarität und somit die Wasserlöslichkeit von Quercetin erhöht wird. Dabei ist Glucose der am häufigsten vorkommende Zucker, welcher über β -O-glycosidische Bindung in Position C-3 oder seltener in Position C-7 gebunden ist (FOSSEN et al., 1998). Weitere mögliche Glycosilierungen erfolgen mit Arabinose, Rhamnose, Galactose, Xylose, Lignin oder einer Kombination mehrerer dieser Moleküle (KÜHNAU, 1976; AHERNE & O'BRIEN, 2002). Durch die Bindung des Disaccharids Rutinose (Glucose + Rhamnose) an Quercetin in Position C-3 entsteht beispielsweise das Flavonol Rutin (Abb. 4). In der vorliegenden Arbeit wird überwiegend auf die in Abb. 4 dargestellten Flavonole eingegangen.



Flavonol	R1	R2	R3	R4
Quercetin	OH	OH	H	OH
Kaemferol	H	OH	H	OH
Isorhamnetin	OCH ₃	OH	H	OH
Tamarixetin	OH	OCH ₃	H	OH
Rutin	H	OH	OH	O-Glucorhamnose

Abb. 4: Strukturformeln ausgewählter Flavonole

2.2 Vorkommen und Aufnahme von Flavonoiden

Flavonole sind in hohen Konzentrationen in den äußeren, dem Licht zugewandten Pflanzenteilen wie Blättern, Blüten und Früchten zu finden (HARBORNE, 1999), wohingegen ihr Gehalt in tieferen Pflanzenschichten abnimmt (HERTOG et al., 1992a; KÜHNAU, 1976; CROZIER et al., 1997; HARBORNE, 1999). Mit Ausnahme der Zwiebel sind in unterirdischen Pflanzenteilen nur Spuren von Flavonolen zu finden (HERTOG et al., 1992a). Flavonoide sind in Pflanzen tolerant gegenüber Sauerstoff, Trockenheit, Hitze und gemäßigter Säureeinwirkung, wobei sie unter Lichteinfluss modifiziert werden können. Durch die Glycosilierung der Hydroxylgruppen wird die Stabilität der Flavonoide gegenüber Licht gesteigert. Ihre Akkumulation in peripheren Pflanzenteilen dient dem UV-Schutz der Pflanzen (HARBORNE & WILLIAMS, 2000; SMITH et al., 2000).

Flavonole kommen in unterschiedlichen Konzentrationen in pflanzlichen Lebensmitteln vor. Die Gehalte in Früchten, Gemüse und Getränken wie Wein oder Tee variieren hinsichtlich ihrer Qualität und Quantität in Abhängigkeit von verwendeten Pflanzenteilen, Anbaugebiet sowie Ernte- und Lagerungsbedingungen (HERTOG et al., 1992b; HERTOG et al., 1993; CROZIER et al., 1997; McDONALD et al., 1998). Äpfel sind eine gute Flavonol-Quelle, sie enthalten neben verschiedenen Quercetin-3-O-Glucosiden auch das Flavan-3-ol (-)-Epicatechin (CLIFFORD, 2000; O'LEARY et al., 2003; ERLUND, 2004). Neben Brokkoli, Blaubeeren, Weintrauben und Ginkgo biloba, sind beträchtliche Gehalte an Flavonolen, insbesondere Quercetin, in Zwiebeln zu finden (FOSSEN et al., 1998; MANACH et al., 2004; WILLIAMSON & MANACH, 2005). PERKIN & HUMMEL (1896) berichteten erstmals 1896 über aus den pigmentierten Schalen der Zwiebel isoliertem Quercetin-Aglycon. Das Vorkommen des Quercetin-Aglycons als Hauptflavonoid in den äußeren Zwiebelschalen wird in späteren Publikationen belegt (BRANDWEIN, 1965; FOSSEN et al., 1998; SLIMESTAD et al., 2007; WICZKOWSKI et al., 2008). Im Gegensatz dazu enthalten die inneren, nicht pigmentierten Zwiebelschalen einen beträchtlichen Anteil an Quercetin-Mono- und Diglucosi-

den, wie z.B. das Quercetin-3- bzw. 5-Glucosid oder Quercetin-3,4'-O-Diglucosid (KOEPPEN & VAN DER SPUY, 1961; BRANDWEIN, 1965; MANACH & DONOVAN, 2004). Der Gesamtgehalt an Flavonolen in der Zwiebel wird von SLIMESTAD et al. (2007) mit 270-1187 mg/kg Frischmasse (FM) in gelben und 415-1917 mg/kg FM in roten Zwiebeln angegeben. Derzeit gibt es diverse Zwiebelextrakte auf dem Markt, welche sich möglicherweise zur Anreicherung von Lebens- und Futtermitteln mit Quercetin eignen (EGERT et al., 2012).

Flavonoide sind neben pflanzlichen Lebensmitteln für den Menschen auch in unterschiedlichen Konzentrationen in Futtermitteln enthalten (MANACH et al., 2005; FRAISSE et al., 2007; BESLE et al., 2010). Somit nehmen Nutztiere variierende Mengen mit der regulären Ration auf. Die Gehalte in Futterpflanzen sind allerdings gering, wie Untersuchungen von BESLE et al. (2010) ergaben. In dieser Studie wurden die Polyphenolgehalte verschiedener Futtermittel aus der Milchviehfütterung gemessen. Es zeigte sich, dass Grünfutter mit 35,3 g/kg TM den höchsten und Maissilage mit 3,2 g/kg TM den niedrigsten Polyphenolgehalt aufwies. Die Quercetiningehalte wurden im Weidelgras mit 0,68 g/kg TM angegeben, in anderen Futtermitteln (Maissilage und Grünfutter) konnte das Flavonol nicht quantifiziert werden. Untersuchungen von FRAISSE et al. (2007) bezüglich der Flavonolgehalte von Dauerweiden im französischen Zentralmassiv ergaben Gehalte zwischen 19 und 32 g/kg TM in Abhängigkeit vom Wachstumsstadium der Pflanzen. FRAISSE et al. (2007) halten unter den gegebenen Versuchsbedingungen die Aufnahme von 500 g Polyphenolen pro d beim Rind für möglich.

In der Datenbank des United States Department of Agriculture (USDA) sind die Polyphenolgehalte verschiedener Lebens- und Futtermittel aufgelistet (BHAGWAT et al., 2014). Eine für Nutztiere relevante Auswahl an Futtermitteln ist in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Flavonoid-Gehalte ausgewählter Futtermittel (modifiziert nach BHAGWAT et al., 2014)

	Flavonoid	Gehalt [mg/kg TM]
Augenbohne, roh	Quercetin	55
Buchweizen	Quercetin	153,8
Buchweizenkleie	Quercetin	149
Buchweizenschrot	Quercetin	70,9
Gerste	(+)-Catechin	23,9
Soyabohne, grün, roh	Kaempferol	12,3
	Quercetin	0,3
Soyabohne, reif, roh	(-)-Epicatechin	374

Die bedeutendste Catechin-Quelle in der menschlichen Ernährung ist Tee (*Camellia sinensis*). Dazu tragen der weltweit hohe Konsum von 40 l pro Jahr und Person und der hohe Gehalt an Catechinen in der Trockensubstanz (30 % bei schwarzem und 39 % bei grünem Tee) bei (GRAHAM, 1992). Hauptvertreter in grünem Tee sind die monomeren Catechine, wobei mengenmäßig das EGCG (mit 1/3 der Gesamtcatechine in frischen Blättern) am stärksten vertreten ist (GRAHAM, 1992; WANG & HO, 2009). Durch Verarbeitungsprozesse bei der Teeherstellung (Fermentation von grünem Tee zur Herstellung von schwarzem Tee) werden durch Oxidations- und Polymerisierungsreaktionen die monomeren Flavanoole in polymere Kondensationsprodukte umgewandelt. Diese farb- und geschmacksgebenden Polymerisierungsprodukte des schwarzen Tees sind im grünen Tee nur in geringen Konzentrationen vertreten (WISEMAN et al., 2001; WANG & HO, 2009).

In der japanischen Teeindustrie fallen rund 100.000 t Teesatz (FM) pro Jahr an, welcher reich an Rohprotein (34,8 %), Aminosäuren, Tanninen und Catechinen ist (KONDO et al., 2004a; YAMAMOTO et al., 1997; CAI et al., 2001; XU et al., 2007). Damit stellen Teeabfälle potenzielle Futtermittel in der Rinderfütterung dar (KONDO et al., 2004b; NISHIDA et al., 2006).

Mittlerweile sind zahlreiche Pflanzenextrakte mit teilweise beträchtlichen Gehalten an Polyphenolen einschließlich verschiedener Flavonole und Flavanoole kommerziell erhältlich (BROUDISCOU et al., 2000). Durch ihren Einsatz in der Fütterung sollen Leistung und Gesundheitsstatus landwirtschaftlicher Nutztiere gesteigert bzw. positiv beeinflusst werden. In der praktischen Milchkuhfütterung gewinnt der Einsatz verschiedenster Pflanzenextrakte und Roborantien als Leistungsförderer sowie zur Prävention von Stoffwechselstörungen zunehmend an Bedeutung. Allerdings fehlen häufig wissenschaftlich fundierte Untersuchungen über Aufnahme und Wirkungsweise derartiger im Handel erhältlicher pflanzlicher Futtermittelzusätze.

2.3 Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit ist eine pharmakologische Messgröße für den Anteil eines applizierten Wirkstoffes, der unverändert in den systemischen Kreislauf gelangt, dann zu den Zielgeweben transportiert wird, um dort seine Wirkung entfalten zu können (AKTORIES et al., 2013). Die Bioverfügbarkeit einer Substanz wird u.a. maßgeblich durch Absorption, Verteilung, Metabolisierung und Elimination derselben beeinflusst und unterscheidet sich z.T. erheblich zwischen verschiedenen Flavonoiden. Auf die wichtigsten Erkenntnisse zur Bioverfügbarkeit von Flavonoiden soll im Folgenden eingegangen werden.

Nach oraler Aufnahme erfolgt die Absorption polyphenoler Aglyca bei monogastrischen Spezies hauptsächlich im Dünndarm (CRESPY et al., 2003; MANACH & DONOVAN, 2004; DEL RIO et al., 2013). Da außer den Flavanolen, die meisten Flavonoide in glycosilierter Form mit der Nahrung aufgenommen werden, ist für die Absorption die Hydrolysisierung dieser Substanzen durch Enzyme notwendig. Dabei erfolgt die Absorption eines Großteils der Flavonoide nach derzeitigem Wissensstand auf zwei Wegen. Ein Mechanismus besteht in der Abspaltung des Zuckerrests vom Aglycon durch das Enzym Laktase Phloridzin Hydrolase (LPH) in der Bürstensaummembran des Dünndarmepithels. LPH weist dabei eine breite Substratspezifität für Flavonoid-O- β -D-Glucoside auf und das freigesetzte Aglycon kann dann passiv durch die Membran diffundieren (DAY et al., 2000a). Ein weiterer Absorptionsmechanismus wird durch die cytosolische β -Glucosidase (CBG) in den Epithelzellen vermittelt. Damit die CBG-katalysierte Hydrolyse stattfinden kann, müssen die polaren Glucoside zunächst in die Epithelzellen transportiert werden, was nach Angaben einiger Autoren über den Natrium-abhängigen Glucosetransporter (SGLT1) erfolgt (GEE et al., 1998; GEE et al., 2000; ADER et al., 2001; WOLFFRAM et al., 2002; DAY et al., 2003). In den Epithelzellen wird dann das Aglycon durch CBG freigesetzt. Im Gegensatz zu den eben beschriebenen Absorptionsmechanismen, erfolgt die Absorption der Catechine vermutlich über passive Diffusion, da sie natürlicherweise als Aglyca vorkommen und somit lipophil sind (CRESPY et al., 2003)(Abb. 5).

Bevor die Polyphenol-Aglyca postabsorptiv in den Blutkreislauf gelangen, unterliegen sie den Phase I- und II-Reaktionen in der Dünndarmmucosa (Sulfatierung, Glucuronidierung und Methylierung) durch Sulfotransferasen (SULTs), Uridin-5'-Diphosphat-Glucuronosyltransferasen (UGTs) und Catechol-O-Methyltransferasen (COMTs)(MANACH & DONOVAN, 2004; DEL RIO et al., 2013). Der Efflux einiger Metaboliten zurück in das Dünndarmlumen erfolgt durch ATP-Transporter (ABC), wie z.B. das Multidrug-Resistance-Protein 2 (MRP2) oder das Breast Cancer-Resistance-Protein 1 (BCRP1)(WALGREN et al., 2000; PETRI et al., 2003) oder möglicherweise auch über den Glucose-Transporter GLUT2 (VAN DE WETERING et al., 2009; MANZANO & WILLIAMSON, 2010). Vom Blut gelangen die Metaboliten in die Leber, wo sie weiteren Phase II-Reaktionen unterliegen, um dann teilweise über die Galle in den Dünndarm zu re-zirkulieren (DONOVAN et al., 2001).

Im Dünndarm können wie oben erwähnt nur Aglyca und einige Monoglucoside absorbiert werden, wohingegen mit einer Rhamnose verknüpfte Polyphenole erst im Colon nach Abspaltung des Zuckers durch bakterielle Rhamnosidasen absorbiert werden (MANACH et al., 1995; HOLLMAN & KATAN, 1997)(Rutin, Abb.5). Das gilt ebenso für Quercetin-

Monoglycoside wie Quercetin-3-Galactosid, Quercitrin, Quercetin-3-Arabinosid sowie das Quercetin-Diglycosid Rutin, die ebenfalls erst im Colon nach Spaltung der unterschiedlichen Zuckerreste durch mikrobielle α -Rhamnosidasen und β -Glucosidasen absorbiert werden können (DAY et al., 1998; HOLLMAN et al., 1999; LAMBERT, 1999; CERMAK et al., 2003; ARTS et al., 2004). Dabei ist die Art des Zuckerrestes Ausschlag gebend für den Umfang der Absorption und ist damit entscheidend für das Ausmaß der Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Glycosiden.

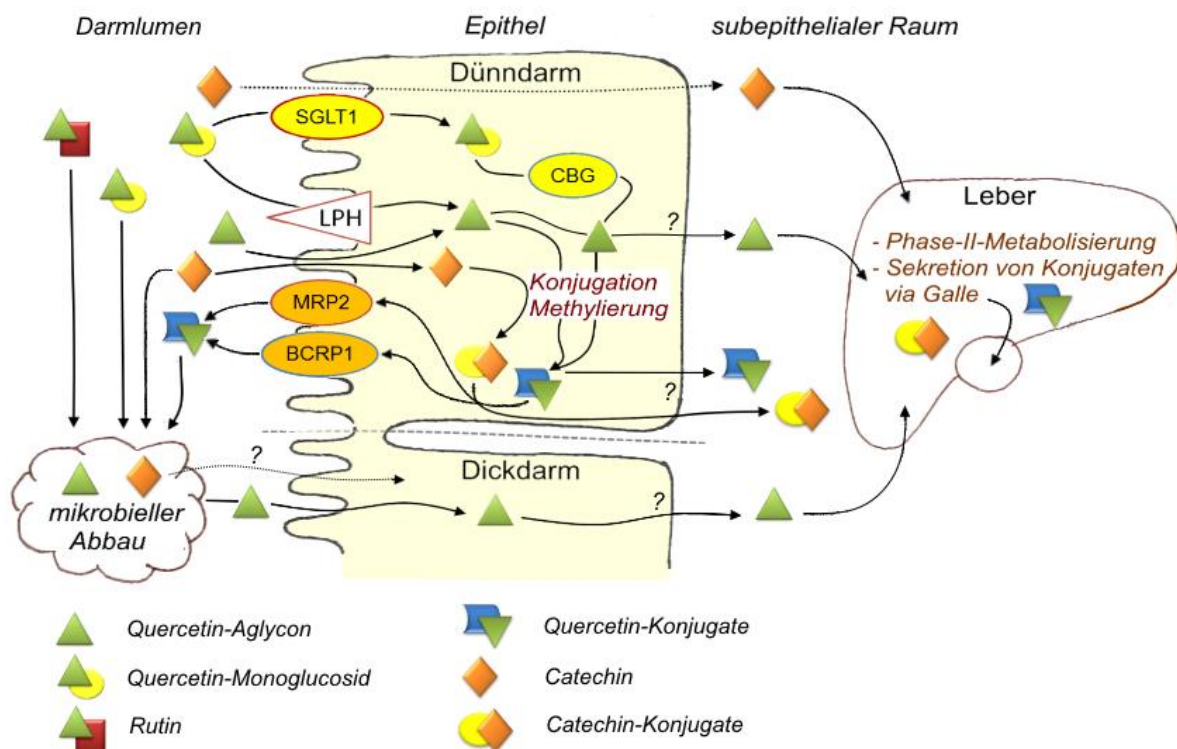


Abb. 5: Mögliche Absorptions- und Metabolisierungsmechanismen ausgewählter polyphenolischer Verbindungen im Dünndarm. BCRP1 = Breast Cancer-Resistance-Protein 1, CBG = cytosolische β -Glucosidase, LPH = Laktase Phloridzin Hydrolase, MRP 2 = Multidrug-Resistance-Protein 2 (MORAND et al., 2000; DONOVAN et al., 2001; WOLFFRAM et al., 2002; CRESPIY et al., 2003; MANACH & DONOVAN, 2004; LESSER & WOLFFRAM, 2006)

Im Plasma liegen Quercetin und Catechine hauptsächlich in konjugierter Form vor (KUHNLE et al., 2000; DONOVAN et al., 2001; MANACH et al., 2004; MANACH & DONOVAN, 2004; STALMACH et al., 2009). In einer Humanstudie von MULLEN et al. (2006) konnten nach einmaliger oraler Aufnahme von gebratenen Zwiebeln mit einem Gehalt von 275 μ mol Flavonol-Mono- und Diglycosiden innerhalb der ersten 30 min sulfatierte und glucuronidierte Quercetin- und Isorhamnetin-Formen im systemischen Kreislauf festgestellt werden, was

auf die Spaltung der konjugierten Zuckerketten im proximalen Dünndarm und Metabolisierung des freigesetzten Aglycons durch SULT's, UGT's und COMT's in den Enterozyten hinweist, bevor diese Metaboliten schließlich via Portalblut in Leber und den systemischen Kreislauf gelangen. Weitere Studien an Schwein, Ratte, Hund und Mensch belegen, dass im Plasma keine Quercetin-Aglyca oder ursprünglichen intakten Quercetin-Glycoside auftauchen (DAY et al., 1998; GEE et al., 2000; MORAND et al., 2000; DAY et al., 2001; GRAEFE et al., 2001; CERMAK et al., 2003; REINBOTH et al., 2010). Bei dem im Plasma zirkulierenden Quercetin handelt es sich um konjugierte und methylierte Formen, wie Isorhamnetin und Tamarixetin (3'- und 4'-Methylquercetin), welche wiederum zum größten Teil in konjugierter Form vorliegen (ADER et al., 2000; GRAEFE et al., 2001; CERMAK et al., 2003; CHEN et al., 2005; REINBOTH et al., 2010). Der Anteil konjugierter Quercetin-Derivate im Plasma ist speziesabhängig sehr variabel, worauf in der Diskussion näher eingegangen wird.

Die Verteilung der Flavonoide in den Geweben wurde in verschiedenen Studien über die Bestimmung der Gehalte in Organen und Geweben untersucht (DE BOER et al., 2005; GRAF et al., 2006; BIEGER et al., 2008). So konnten nach einer einmaligen Applikation von Quercetin in Leber und Niere bei Schwein und Ratte teilweise höhere Gehalte (8,6 und 3,96 nmol/g Frischgewebe) als im Plasma festgestellt werden (DE BOER et al., 2005; BIEGER et al., 2008). In Lunge, Milz, Muskulatur, Herz und Gehirn dagegen wurden in diesen Versuchen nur geringe Gehalte von max. 0,57 nmol/g Frischgewebe festgestellt.

Die Arbeitsgruppe CRESPI et al. (2003) hat in einem *in situ*- Versuch an Dünndarm-perfundierten Ratten den Metabolismus verschiedener Flavonoide untersucht. Die daraus errechneten systemischen Verfügbarkeiten ausgewählter Flavonoide sind in Abb. 6 dargestellt. Daraus geht hervor, dass die systemische Verfügbarkeit der untersuchten Flavonoide vom Umfang der Absorption am Dünndarmepithel, der mukösen und serösen Sekretionsintensität der Konjugate sowie der Sekretionsintensität über die Galle ab hängt (CRESPI et al., 2003). Der Nettotransfer an der Bürstensaummembran liegt bei 15, 58 und 35 % für Quercetin, Kaempferol und Catechin. Die biliäre Sekretion ist mit 1 bzw. 6 % für Catechin bzw. Quercetin relativ gering, im Gegensatz zu anderen Flavonoiden (z.B. Genistein mit 30 %, nicht abgebildet).

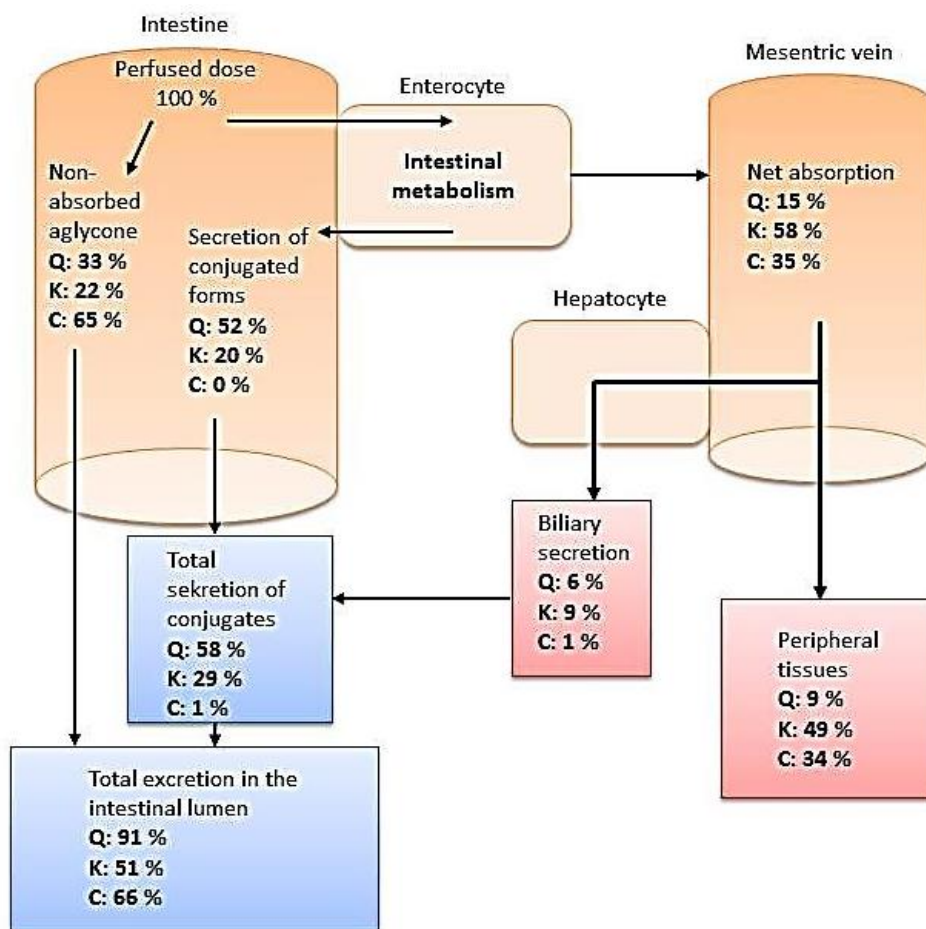


Abb. 6: Schematische Darstellung der systemischen Verfügbarkeit von Quercetin (Q), Kaempferol (K) und Catechin (C) (nach CRESPIY et al., 2003)

Auf weitere im Rahmen der vorliegenden Arbeit bedeutende Absorptions- und Verteilungsmechanismen, im Besonderen im Hinblick auf die systemische Verteilung im Wiederkäuer, wird in der Diskussion näher eingegangen.

Mikrobieller Abbau der Flavonoide

Der mikrobielle Abbau im Pansen hat einen entscheidenden Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden beim Wiederkäuer. Die bei monogastrischer Spezies am Dünndarm verfügbaren Aglyca und Monoglucoside, unterliegen beim Wiederkäuer bereits dem Abbau durch die Pansenbakterien und sind demzufolge am Dünndarm des Wiederkäuers nicht verfügbar. Bisher gibt es wenige Erkenntnisse bezüglich der mikrobiellen Abbauprozesse im Vormagensystem von Wiederkäuern, wobei allerdings davon ausgegangen werden kann, dass Erkenntnisse von monogastrischen Spezies zum mikrobiellen Abbau im Dickdarm auf den Wiederkäuer übertragbar sind. Dabei ist anzumerken, dass die meisten Erkenntnisse in der Literatur über den mikrobiellen Abbau von Flavonoiden aus *in vitro*- Versuchen stammen und die Übertragung auf *in vivo*- Vorgänge durchaus kritisch zu betrachten ist.

Beim Monogastrier werden am Colon ankommende Flavonoide umfangreich mikrobiell bis hin zu einfachen phenolischen Verbindungen abgebaut. Bisher wurden verschiedene obligat anaerobe Bakterienstämme in menschlichen Faeces identifiziert, welche in der Lage sind Glycoside enzymatisch zu spalten (MACDONALD et al., 1984; BOKKENHEUSER et al., 1987; KIM et al., 1998). So fanden BOKKENHEUSER et al. (1987) und KIM et al. (1998) heraus, dass einige Stämme von *Bacteroides* spp. α -Rhamnosidasen und β -Galactosidasen bilden, wohingegen andere Stämme von *Bacteroides* spp. sowie *Streptococcus* spp. in der Lage sind β -Glucosidasen zu produzieren.

In einer neueren Arbeit von ULBRICH et al. (2015) wurde der mikrobielle Abbau von aus Zwiebeln isolierten Quercetin-Mono- und Diglucosiden durch *Eubacterium ramulus* und *Flavonifractor plantii* aus menschlichen Faeces untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass nur *E. ramulus* in der Lage war die Quercetin-Glucoside (Quercetin-4'-Monoglucosid bzw. Quercetin-3,4'-Diglucoside zu fast 100 % innerhalb der ersten 24 bzw. 10 h) zu spalten. Das asaccharolytische *F. plantii* dagegen konnte nur das Aglycon abbauen. Schon in früheren Studien wird der Abbau von Quercetin durch *E. ramulus* aus menschlichen Faeces beschrieben (BRAUNE et al., 2001). Die Autoren postulieren, dass der Abbau nur in Anwesenheit von Glucose zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und Phloroglucinol über die Zwischenprodukte Taxifolin und Alphononin erfolgt. Ergänzend dazu haben SCHNEIDER & BLAUT (2000) herausgefunden, dass *E. ramulus* nur in der Lage ist den Zuckerrest aus den Positionen 3-O und 7-O zu nutzen, nicht aber aus der 5-O-Position. Die Aktivität bezüglich des Quercetinabbaus von *F. plantii* dagegen ist u.a. von der Aktivität anderer Flavonoid-abbauender Bakterienstämme, wie z.B. *E. ramulus*, *Enterococcus casseliflavus* (SCHNEIDER et al., 1999), *Clostridium perfringens* (ZHANG et al., 2014) oder *Bacteroides* spp. (BOKKENHEUSER et al., 1987) abhängig. Das freigewordene Quercetin-Aglycon wird laut ULBRICH et al. (2015) nicht von den eben genannten Bakterienstämmen genutzt, steht dafür aber als Energiequelle für *E. ramulus* zur Verfügung.

Der mikrobielle Abbau von Flavonoiden ist letztendlich abhängig von Art und Konzentration des Polyphenols, dem Substrat bzw. den Futtermitteln mit den darin befindlichen Bakterienstämmen, sowie der Verweildauer im Substrat selbst (RECHNER et al., 2004). Durch den Abbau werden zum einen Art und Umfang entstehender Transformationsprodukte beeinflusst und zum anderen Aktivierung oder Deaktivierung inaktiver oder aktiver Flavonoide bewirkt (BLAUT et al., 2003).

2.4 Wirkungen und Wirkungspotential

Flavonole und Flavanole besitzen diverse in zahlreichen Studien nachgewiesene gesundheitsfördernde Effekte. Neben antimikrobiellen, antioxidativen, antifungalen und antiviralen Effekten (CUSHNIE & LAMB, 2005) werden ihnen beim Menschen u.a. antikanzerogene sowie positive Effekte in Bezug auf cardiovasculäre Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ 2 zugeschrieben (SCALBERT et al., 2005; KHAN & MUKHTAR, 2007; DAI & MUMPER, 2010; DEL RIO et al., 2013). Dies geschieht über verschiedenste Wirkmechanismen, die eingehend *in vitro* untersucht und in der Literatur beschrieben wurden. So konnte nachgewiesen werden, dass antioxidative Effekte beispielsweise aus der Bildung von Metallchelaten, durch Enzymhemmung oder dem Abfangen freier Radikale resultieren. Antikanzerogene Wirkungen von Flavonoiden werden dagegen durch Enzyminhibierung, antioxidative Effekte oder Einflüsse auf die Gen-expression vermittelt (ERLUND, 2004). Das Flavonol Quercetin hat nachgewiesenermaßen eine hemmende Wirkung auf im Rahmen der Signalkaskade wirkende Enzyme, wie beispielsweise Phospholipase A2 und C, Proteinkinase C, zyklische Nucleotid-Phosphodiesterasen oder mitogen-aktivierte Proteinkinase (MIDDLETON JR. & KANDASWAMI, 1992; AGULLO et al., 1997; GAMET-PAYRASTRE et al., 1999; MIDDLETON et al., 2000; KO et al., 2004). Des Weiteren inhibiert Quercetin verschiedene Adenosintriphosphatasen, Polymerasen, Cytochrom P450-Oxidoreduktasen, Topoisomerasen und Desoxyribonucleinsäure-Gyrase (OHEMENG et al., 1993; BERNARD et al., 1997; ZHAI et al., 1998; MIDDLETON et al., 2000; PLAPER et al., 2003). In weiteren Studien konnte dem Quercetin ebenfalls eine hemmende Wirkung auf am Fettstoffwechsel beteiligte Enzyme, wie Cyclooxygenasen, Lipoxxygenasen, Acetyl-Co-A-Carboxylase und Diacylglycerol-Acyltransferase, nachgewiesen werden (LIANG et al., 1999; MIDDLETON et al., 2000; BAI & ZHU, 2008; GNONI et al., 2009; BAI & ZHU, 2010).

Im Hinblick auf mögliche biologische Wirkungen beim Wiederkäuer ist allerdings anzumerken, dass in der Literatur vorliegende Ergebnisse bezüglich der Wirkungen von Flavonoiden überwiegend *in vitro* ermittelt wurden und bis auf wenige, die antimikrobielle Aktivität betreffenden Untersuchungen, an monogastrischen Spezies durchgeführt wurden. Die Übertragung der Erkenntnisse auf Wirkungen im Wiederkäuer sind teilweise durchaus denkbar, zumindest sind viele *in vitro*- gewonnenen Erkenntnisse auch *in vivo* von großer Relevanz. Im Folgenden soll auf zwei für den Wiederkäuer wichtige Wirkungsbereiche von Quercetin und Catechinen näher eingegangen werden.

Antimikrobielle Wirkungen und Einflüsse auf Fermentationsprozesse

Die Besonderheit des Wiederkäuers im Gegensatz zur monogastrischen Spezies liegt in seinem Vormagensystem mit den Mikroorganismen, welche die Futterverwertung und folglich die Leistung des Tieres beeinflussen. Da der Wiederkäuer auf die mikrobielle Aktivität im Pansen angewiesen ist, sind die antimikrobiellen Effekte der Flavonoide und damit mögliche negative Auswirkungen auf die mikrobielle Aktivität, von besonderer Bedeutung.

Es ist bekannt, dass Flavonoide in Pflanzen z.B. als Reaktion auf mikrobielle Infektionen synthetisiert werden (DIXON et al., 1983), weshalb ihre *in vitro* und *in vivo* nachgewiesenen antimikrobiellen Effekte auf eine große Reihe von Mikroorganismen durchaus nachvollziehbar sind (COWAN, 1999). Die antimikrobielle Aktivität von Flavonoiden ist bisher umfangreich untersucht worden, wobei widersprüchliche Aussagen zu finden sind, welche möglicherweise auf unterschiedliche nicht standardisierte Untersuchungsmethoden zurückzuführen sind (CUSHNIE & LAMB, 2005). Bei einigen gut erforschten Flavonoiden stimmen die Erkenntnisse in der Literatur allerdings weitgehend überein. Eine Übersicht über pflanzliche, antimikrobiell wirkende Flavonoide ist in der Arbeit von COWAN (1999) zusammengefasst.

Derzeit geht man hauptsächlich von drei verschiedenen antibakteriellen Wirkmechanismen aus: Inhibierung der Nucleinsäuresynthese, Inhibierung der cytoplasmischen Membranfunktionen, sowie Hemmung des Energiestoffwechsels der Bakterien (CUSHNIE & LAMB, 2005). Zur Inhibierung der Nucleinsäuren konnten MORI et al. (1987) in einer Studie mit 29 verschiedenen Flavonoiden zeigen, dass einerseits die DNA-synthese in *Proteus vulgaris* sowie auch die RNA-synthese in *Staphylococcus aureus* durch EGC gehemmt wird. Die Autoren vermuten, dass der B-Ring durch Interkalation in oder Wasserstoffbindungen an den Nucleinsäure-Strängen eine Rolle bei der Inhibierung der Bakterienaktivität spielt. OHMENG et al. (1993) haben in einer Studie den Einfluss 14 verschiedener Flavonoide auf die bakterielle Aktivität einiger Bakterienstämme wie z. B. *E. coli*, *Staph. epidermis* und *Staph. aureus* untersucht. Dabei konnten die Autoren eine hemmende Wirkung auf die DNA-Gyrase, ein für die Replikation in Prokaryonten notwendiges Enzym, der *E. coli* - Erreger unter anderem durch Quercetin nachweisen. Diese Wirkung beschränkt sich laut OHMENG et al. (1993) aber nur auf Flavonoide mit Hydroxylgruppen am B-Ring. In einer späteren Studie von PLAPER et al. (2003) wurde ergänzend dazu der Zusammenhang zwischen der Bindung des Quercetins an die Gyrase-B Untereinheit von *E. coli* und der dadurch vermittelten Inhibierung der Enzym-ATPase-Aktivität hergestellt. BERNARD et al. (1997) fanden heraus, dass im Gegensatz zum Quercetin das Glucorhamnosid Rutin keine

inhibierende Wirkung auf die DNA-Gyrase, sondern auf die Topoisomerase IV-abhängige Spaltung der DNA in *E. coli* –Erregern hatte. Die Rutin-induzierte Topoisomerase IV-vermittelte DNA-spaltung führt über eine SOS-Antwort zur Wachstumshemmung der *E. coli* –Erreger.

Catechine besitzen ebenfalls eine starke antimikrobielle Aktivität. Verschiedene Autoren haben *in vitro* die Hemmung der Flavonole gegen *S. mutans* (SAKANAKA et al., 1989; SAKANAKA et al., 1992; RASHEED & HAIDER, 1998), *Shigella* spp. (VIJAYA et al., 1995) und weitere Bakterienstämme nachgewiesen (SAKANAKA et al., 1992; RASHEED & HAIDER, 1998). Ein möglicher Mechanismus ist dabei laut NAKAHARA et al. (1993) die Inhibierung der Glucosyltransferase in *S. mutans* durch Komplexbildung.

Zur Inhibierung der cytoplasmischen Membranfunktionen wurde in einer *in vitro*- Studie anhand von Modellmembranen gezeigt, dass Epigallocatechingallat (EGCG) die inneren Zellmembranen von Bakterien zerstört, wobei den Autoren die genaueren Ursachen noch unklar sind (IKIGAI et al., 1993).

Die bisher am häufigsten untersuchten Erreger, wie z.B. *S. aureus* und *E. coli* sind weniger im Pansen des Wiederkäuers denn im Colon monogastrischer Spezies vorkommende Bakterienstämme, teils pathogener Natur. Es ist aber durchaus denkbar, dass die oben beschriebenen Wirkmechanismen auf ruminospezifische gram- negative und gram- positive Mikroben übertragbar sind und somit einen Einfluss auf Fermentationsprozesse im Pansen haben. Dabei kann es vor dem Hintergrund der antimikrobiellen Aktivitäten durch den Einsatz von Flavonoiden zu verändertem Fettsäuremuster bzw. CO₂/CH₄-Produktion im Pansen kommen. CERMAK et al. (2006) konnten *in vitro* keinen Einfluss von Quercetin, Isoquercitrin bzw. Rutin (50 bzw. 100µmol/l) auf das Fettsäuremuster kurzkettiger Fettsäuren (KKFS) als Parameter für die mikrobielle Aktivität feststellen. Im Gegensatz dazu führte in einer anderen Untersuchung der Einsatz von Quercetin (1,5 mmol/l) *in vitro* zu signifikant höherer Gesamtkonzentration kurzkettiger Fettsäuren (LOURENÇO et al., 2008). In einer Studie von LEIBER et al. (2012) wurde u.a. der Einfluss von Rutin (0, 5, 50 und 500µmol Quercetinäquivalente/l) auf verschiedene Fermentationsparameter mittels Hohenheimer Futterwerttests (HFT) untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass sowohl die Gasbildung als auch die Konzentration der Gesamtfettsäuren (Acetat + Propionat + Butyrat) durch den Einsatz von 5 bzw. 500 µmol Quercetinäquivalente/l erhöht waren. Untersuchungen von BROUDISCOU et al. (2000) zum Einfluss verschiedener flavonoidhaltiger Pflanzenextrakte auf *in vitro* ermittelte Fermentationsparameter im Pansen, führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. So bewirkte der Einsatz von Goldrute (*Solidago virgaurea*, 16,2 % Rutin)

einen Anstieg der Acetat- und Propionatproduktion (11,3 und 15,8 %) sowie die Steigerung der CO₂- und CH₄-Produktion (7,8 und 7,7 %)(BROUDISCOU et al., 2000). Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von Ackerschachtelhalm (*Equisetum Arvense*, > 0,3 % Isoquercitrin) nicht zu einer Veränderung in der Fettsäurenkonzentration, aber mit 10,6 und 14,2 % zu einer deutlich erhöhten Acetat- und Propionatproduktion. *Ginkgo biloba* (4,2 % Quercetin) führte zur Erhöhung des Acetatanteils um 5,7 % und zur Senkung des Butyratanteils um 7,6 % (BROUDISCOU et al., 2000). Auf Grund fehlender Angaben über Art und Gehalte polyphenolischer und sonstiger Inhaltsstoffe in Pflanzenextrakten in den Studien von BROUDISCOU et al. (2000) ist die Zuordnung auftretender Effekte zu einzelnen Flavonoiden nicht ohne weiteres möglich und sollte daher kritisch betrachtet werden.

Die kontroversen Ergebnisse der Studien zum Einfluss von Flavonoiden oder flavonoidhaltiger Pflanzenextrakte zeigen, dass von diesen Substanzen nicht nur antimikrobielle Effekte, sondern auch die Stimulation der mikrobiellen Aktivität ausgehen kann. Dabei führt ein hoher Flavonoidgehalt in Pflanzenteilen- oder extrakten nicht zwangsläufig zu irgendeinem Effekt. Vor dem Hintergrund der praktischen Milchkuhfütterung und den dabei natürlicherweise in Futtermitteln enthaltenen Polyphenolgehalten, sind nach derzeitigem Kenntnisstand keine negativen Effekte im Hinblick auf Fermentationsprozesse zu erwarten.

Einflüsse auf den Glucose- und Fettstoffwechsel

Auf Grund der bei monogastrischen Spezies beschriebenen Wirkungen bzw. des aus *in vitro*- Untersuchungen abgeleiteten Wirkungspotenzials von Quercetin und Catechinen ist ihr Einsatz in der Früh-laktation bei Hochleistungskühen von besonderem Interesse (MARTENS & BREVES, 2015). In dieser Phase befinden sich die Tiere auf Grund unzureichender Futteraufnahme bei gleichzeitig stark erhöhtem Energiebedarf in einem Energie-defizit, welches durch Einschmelzen des Körperfetts durch das Tier kompensiert wird. Dadurch kommt es zu einem Anstieg nicht-veresterter Fettsäuren (NEFA) im Blut, welche entweder in der Leber akkumulieren oder zu Acetyl-CoA abgebaut werden (KEHRLI et al., 2006). Überschüssiges Acetyl-CoA wird zu Ketonkörpern umgewandelt, welche in Blut und Leber akkumulieren und letztendlich im Stoffwechsel häufig zu klinischen Störungen wie Fettleber und Keto-acidosen führen können (VERNON, 2005; INGVARTSEN, 2006; VAN KNEGSEL et al., 2007).

Im Hinblick auf stoffwechselphysiologische Vorgänge in der Früh-laktation wurde in der Literatur das Auftreten eines Insulinmangels und damit einhergehender Insulinresistenz infolge erhöhten NEFA-Gehaltes im Blut in Zusammenhang gebracht (BELL, 1995; MARTENS & BREVES, 2015). Des Weiteren beschreiben die Autoren MARTENS & BREVES

(2015) in diesem Zusammenhang erhöhte Konzentrationen des Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), einem proinflammatorischen Cytokin, was möglicherweise ebenfalls zu Insulinresistenz führt. Die Milchkuh befindet sich demnach in dieser Stoffwechselsituation in einer Art „diabetischem Zustand“, bei dem die Insulinresistenz das Krankheitsbild des Tieres mit bestimmt (INGVARTSEN, 2006). Verschiedene Studien haben den positiven Einfluss von Flavonoiden auf Diabetes-relevante Stoffwechselfparameter, wie Glucose und Insulin, hervorgebracht (WOLFRAM et al., 2006b; BOSE et al., 2008; RIVERA et al., 2008; YOUL et al., 2010; KIM et al., 2011). Untersuchungen zum Einfluss von Langzeit-appliziertem EGCG (3,2 g/kg KM) auf die eben genannten Parameter bei mit fettreicher Ration gefütterten Mäusen (60 % Energie als Fett/Ration), konnten eine verminderte Insulinresistenz sowie verringerte Triglyceridgehalte und -akkumulation in der Leber nachweisen (BOSE et al., 2008). Die Arbeitsgruppe von WOLFRAM et al. (2006b) hat ebenfalls einen positiven Einfluss von EGCG auf den Glucose- und Fettmetabolismus in Nagern feststellen können. Dabei senkte das Catechin die mRNA-Expression für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase in Rattenhepatomzellen (H4IIE), in Leber- und Fettgewebe bei db/db Mäusen und ZDF Ratten (Typ-2-Diabetes-Modelle) womit eine Verbesserung der Glucose-Toleranz bei den Nagern erklärt wurde (WOLFRAM et al., 2006b). RIVERA et al. (2008) haben eine Verbesserung der Insulinsensitivität bei adipösen diabetischen Ratten durch die chronische Applikation von Quercetin (2 bzw. 10 mg/kg KM) nachgewiesen. Nach Verabreichung der hohen Dosierung (10 mg Quercetinäquivalente/kg KM) konnte zudem ein anti-inflammatorischer Effekt im adipösen Gewebe der Tiere beobachtet werden (RIVERA et al., 2008). Im Hinblick auf in der Früh-laktation auftretende entzündungsbedingte Erkrankungen, wie Mastitiden oder Klauenerkrankungen, könnte dieser positive Effekt bei der Milchkuh ebenfalls von Bedeutung sein (KEHRLI et al., 2006).

Des Weiteren werden im Zusammenhang mit Infektionskrankheiten infolge der negativen Energiebilanz in der Transitphase der Milchkuh eine ungenügende Immunantwort diskutiert (MARTENS & BREVES, 2015). Es wird angenommen, dass das Hormon Leptin die Wechselwirkungen zwischen Energiestoffwechsel und Immunsystem vermittelt. In Folge der postpartalen energetischen Unterversorgung ist die Leptin-Plasma-Konzentration verringert, wodurch es zur verringerten Immunantwort und erhöhten Infektionsanfälligkeit kommt (BLOCK et al., 2001; MARTENS & BREVES, 2015). Verschiedene Studien haben den positiven Einfluss von Catechin auf den Leptingehalt im Plasma nachweisen können (WOLFRAM et al., 2006a; KAO et al., 2000). Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie von WEIN et al. (2010)

kein Effekt von Quercetin (0,03 %, w/w) bei mit fettreicher Ration (19 %, w/w) gefütterten Ratten auf den Leptingehalt im Plasma festgestellt werden.

Neben Untersuchungen zu Einflüssen von Flavonoiden im Zusammenhang mit Diabetes werden in einigen Arbeiten auch die Wirkungen von Flavonoiden auf den Glucosestoffwechsel in physiologischem Zustand beschrieben. So haben GASPARIN et al. (2003a) in verschiedenen *ex vivo*- Versuchen an perfundierten Rattenlebern zum einen die Steigerung der Glycogenolyse und zum anderen die Hemmung der Glycolyse und Gluconeogenese durch Quercetin (50-300 µmol/l) nachweisen können. Die Autoren erklären diese Effekte einerseits mit der Hemmung von Enzymsystemen (z.B. Glucose-6-Phosphatase und K⁺-ATPase/Na⁺-ATPase) sowie andererseits mit verbesserter mitochondrialer Energieübertragung durch das Quercetin (GASPARIN et al., 2003a; GASPARIN et al., 2003b).

Inwieweit der Einsatz von Flavonoiden beim Wiederkäuer zur Reduktion oben genannter Stoffwechselerkrankungen führen kann, ist auf Grund der hier beschriebenen Erkenntnisse über *in vitro*- und *in vivo*- Effekte der Flavonoide nicht belegt. Oral applizierte Flavonoide unterliegen umfangreichen Metabolisierungsprozessen (s. 2.3), wodurch sie nur begrenzt systemisch verfügbar sind. Die in *in vitro*- Versuchen erhobenen Effekte liefern einerseits nur einen Hinweis auf biologisch relevante Wirkungen, andererseits kann daraus keine Aussage über die systemisch verfügbare Menge *in vivo* getroffen werden, die aber wiederum für postabsorptive Wirkungen im Tier unerlässlich ist. Daher ist vor der Beurteilung möglicher Wirkungen von Flavonoiden bei der Milchkuh, die Untersuchung ihrer systemischen Verfügbarkeit von zentraler Bedeutung.

3. Material und Methoden

In Kapitel drei werden Material und Methoden der folgenden sechs Versuche beschrieben:

Catechinexperimente:

V1: Versuch zur Bioverfügbarkeit von Catechinen (*in vivo*)

V2: Einfluss von Catechinen auf die Gasbildung (*in vitro*)

V3: Ruminaler Abbau von Catechinen (*in vitro*)

Versuche zur Bioverfügbarkeit von Quercetin:

V4 + V5: Einfluss von Futterfett auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin (*in vivo*)

V6: Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Zwiebelschalenextrakt und Zwiebelextrakt (*in vivo*)

Verwendete Chemikalien und Geräte sowie im Text nicht aufgeführte Bezugsquellen sind im Anhang A aufgeführt.

3.1 Versuchstiere und Rationsgestaltung

Als Versuchs- und Spendertiere dienten 5 pansenfistulierte, nicht-laktierende Färsen der Rasse Deutsches Schwarzbuntes Niederungsrind. Über die Dauer der Versuche waren die Tiere im Mittel ca. 7 Jahre alt und wogen 537 ± 37 kg (MW \pm SD). Die Haltung der Tiere erfolgte in Anbindehaltung ohne Einstreu.

Die Tiere erhielten eine Ration aus 3 kg Milchleistungsfutter (MLF) 18/3 (August Plambeck GmbH & Co. KG, Brügge, Deutschland) und 3 kg Heu, die zu gleichen Teilen morgens und abends gefüttert wurde. Zusätzlich wurde den Tieren morgens 75 g Mineralfutter (Panto®-Mineral R62, Hamburger Leistungsfutter GmbH, Hamburg, Deutschland) mit dem MLF gegeben. Die Zusammensetzung des MLF bzw. des Mineralfutters sind den Tab. B1 bzw. B2 (Anhang B) zu entnehmen. Zur Adaptation wurde den Tieren bereits sieben Tage vor Beginn der jeweiligen *in vivo*- bzw. *in vitro*- Versuche diese Ration vorgefüttert.

Futtermittelanalyse

Die Futtermittelproben wurden für die Analytik auf eine durchschnittliche Partikelgröße von 1 mm gemahlen. Die Bestimmung der Trockenmasse (TM) sowie Analyse der Rohrnährstoffe wurden mittels Weender-Futtermittelanalyse gemäß den Methoden des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (NAUMANN & BASSLER, 1997) durchgeführt. Die Analysen von Neutraler Detergentienfaser (NDF), Saurer Detergentienfaser (ADF) und Saurem Detergentienlignin (ADL) erfolgte nach dem Verfahren von VAN SOEST et al. (1991). Die ermittelten Nährstoffgehalte sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Rohrnährstoffgehalte des für die Versuchsrationen verwendeten Milchleistungsfutters und Heus in % der Trockenmasse (TM)

Futtermittel	TM	XA	XF	XL	XP	NDF	NDForg	ADF	ADL
Milchleistungsfutter	89,31	7,23	9,32	2,56	20,43	30,06	28,74	13,80	3,39
Heu	91,46	3,63	35,02	0,85	6,78	71,33	69,73	42,95	5,60

XA = Rohasche, XF = Rohfaser, XL = Rohfett, XP = Rohprotein, NDF = Neutrale Detergentienfaser, NDForg = NDF – NDF-Asche, ADF = Saure Detergentienfaser, ADL = Saures Detergentienlignin

Implantation von Verweilkathetern

Einen Tag vor Beginn der *in vivo*- Versuche wurde jedem Tier ein Venenkatheter (Experimente 1-4: VWI-Jugularis-Katheter AD 2,4 mm, Länge 20 cm mit Teflonbeschichtung; Experiment 5: Polyurethan-Katheter Milacath® 14 ga x 20 cm mit antibakterieller Beschichtung) in die *Vena jugularis* implantiert. Zur Verringerung der Koagulation im Katheter, wurden nach jeder Blutentnahme 10 ml einer sterilen, heparinisierten (5000 I.E. Heparin/ml) 0,9 %igen Kochsalzlösung (steril, endotoxinfrei) instilliert. An versuchsfreien Tagen (keine Blutentnahme) wurden die Katheter zusätzlich zur Aufrechterhaltung der Durchgängigkeit zweimal täglich im Abstand von 12 h mit je 10 ml heparinisierten Kochsalzlösung gespült.

3.2 Catechinexperimente

3.2.1 Versuch zur Bioverfügbarkeit von Catechinen (V1)

Drei Tage nach Implantation der Katheter erhielt jedes Tier einmalig mit der Morgenfütterung gemäß dreiarbigem, kontrolliertem Crossover-Design (Abb. 7, $n = 3$) pro Behandlung einen Grünteeextrakt (GTE, Polyphenon 60) in niedriger bzw. hoher Dosierung (10 bzw. 50 mg GTE/kg KM) via Pansenfistel. Die Zusammensetzung des GTE ist Tab. 3 zu entnehmen. Zur Applikation wurde die jeweilige Menge des Extrakts in 500 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung suspendiert. Mit einer Auswaschungsphase von zwei Tagen zwischen den Behandlungen wurde eine nahezu vollständige Eliminierung der Testsubstanzen aus dem Organismus gewährleistet. Als Kontrolle bekamen die Tiere an einem weiteren Testtag ausschließlich 500 ml physiologisches NaCl appliziert.

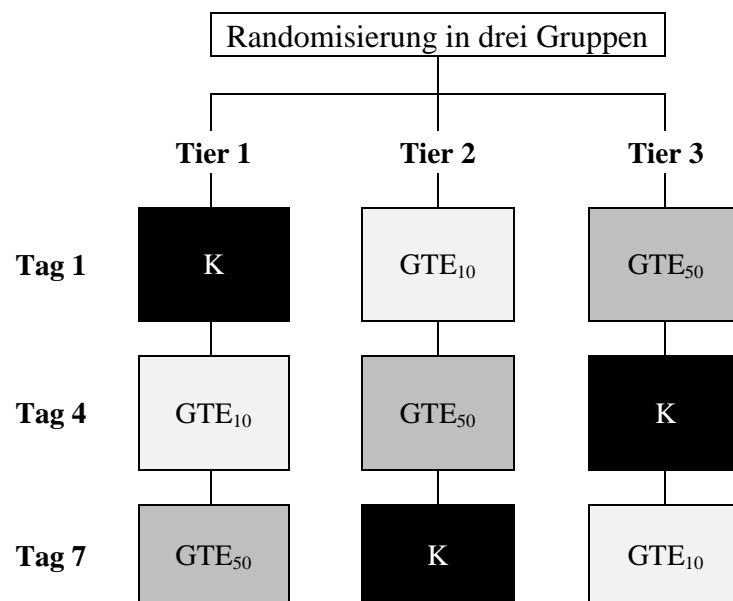


Abb. 7: Versuchsaufbau V1 in dreiarbigem Crossover-Design. K = Kontrolle, GTE₁₀ bzw. 50 = Grünteeextrakt (10 bzw. 50 mg GTE/kg KM)

Tab. 3: Catechinzusammensetzung des Grünteeextrakts Polyphenon 60

	Gehalt [%]
Epigallocatechin (EGC)	19,0
Epicatechin (EC)	6,4
Epigallocatechingallat (EGCG)	28,8
Epicatechingallat (ECG)	7,0
Gallocatechingallat (GCG)	2,1
Catechingallat (CG)	0,3
Gallocatechin (GC)	5,2
Catechin (C)	1,4
Gesamt	70,3
Angaben laut Hersteller Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	

Die Blutentnahme erfolgte mittels Lithium-Heparin Monovette (9 ml) unmittelbar vor (= Zeitpunkt 0) sowie 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 12 und 24 h nach Applikation der Testsubstanzen. Alle Blutproben wurden unmittelbar nach ihrer Entnahme zur Plasmagewinnung 10 min. bei 4 °C und 1.100 g in einer Kälzentrifuge zentrifugiert und das Plasma im Anschluss in Eppendorf-Cups überführt (3 x 1 ml). Zum Schutz der Catechine vor Oxidations- und Abbaureaktionen wurde jeweils zu 1 ml Plasma 20 µl einer Stabilisierungslösung (0,4 mol/l NaH₂PO₄ mit 20 % Ascorbinsäure und 0,1 % EDTA, pH 3,6) hinzugegeben (ZHU et al., 1997; LEE et al., 2000) und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

Bestimmung der Catechine im Plasma

Die Aufbereitung der Plasmaproben zur Bestimmung der Gesamtcatechine (konjugierte und freie Catechine) erfolgte nach der Methode von EGERT et al. (2013). Dazu wurden die tiefgefrorenen Plasmaproben zunächst bei 37 °C im Wasserbad langsam aufgetaut und anschließend jeweils 500 µl Probe mit 37,5 µl Enzymmischung (β-Glucuronidase mit Sulfatase-Aktivität, Typ H-1 aus *Helix pomatia*, finale Aktivitäten 7.300/130 U/ml Glucuronidase/Sulfatase) versetzt, um in den Proben vorliegende Konjugate (Glucuronide, Sulfate) der Catechine zu spalten. Das Gemisch wurde zur vollständigen Hydrolyse der konjugierten Catechine bei 37 °C für 45 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Die enzymatische Spaltung wurde anschließend durch Zugabe von 1 ml Dichlormethan gestoppt. Das Gemisch wurde zunächst 4 min im Reagenzglas-Rotator gemischt und anschließend 15 min bei 4 °C und 2.000 g zentrifugiert. 400 µl des Überstandes wurden in ein Reagenzröhrchen mit Schraubverschluss (10 ml) überführt und mit 1 ml Ethylacetat versetzt. Anschließend wurde die Probe zunächst 4 min horizontal geschüttelt und dann 20 min zentrifugiert (4 °C, 2.000 g).

800 µl des Überstandes wurden danach in ein Reagenzglas überführt. Die Extraktionsschritte mit Ethylacetat wurden weitere zweimal wiederholt und die entnommenen Überstände gepoolt (Poolprobe 2,4 ml). Diese Probe wurde mit 10 µl einer 1 %igen (w/v) wässrigen Ascorbinsäurelösung versetzt und unter Vakuum bei 45 °C bis zur vollständigen Trockene eingedampft. Anschließend wurde der Rückstand in 150 µl des Fließmittels A resuspendiert, 15 min im Ultraschallbad gelöst und anschließend 10 min bei 8.000 g zentrifugiert. Der verbliebene klare Überstand wurde in Vials überführt und zur weiteren Analyse mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit elektrochemischer Detektion verwendet.

Die Bestimmung der Catechine (C, EC, ECG, EGC, EGCG und GC) erfolgte nach der Methode von EGERT et al. (2013). Über den Autosampler wurden 30 µl der Probe in die HPLC-Anlage injiziert und über eine reversed-phase Trennsäule (C-18 Kromasil 100, 25 × 4,6 mm, 5 µm) geleitet. Zum Schutz vor Verunreinigungen war der analytischen Trennsäule eine Vorsäule vorgeschaltet (C-18 Inertsil ODS-2, 10 × 4 mm, 5 µm). Zur Trennung der Catechine wurde eine Gradientenelution durchgeführt (Tab. 4). Die verwendeten Fließmittel A bzw. B enthielten Reinstwasser, Acetonitril und Trifluoressigsäure im Verhältnis (v/v/v) 92:8:0,1 bzw. 65:35:0,1 und wiesen einen pH-Wert von 2,5 auf. Die Catechine wurden bei einer Flussrate von 0,9 ml/min und einer Säulentemperatur von 30 °C aufgetrennt und im nachgeschalteten elektrochemischen Vierkanal-Detektor (Potentiale: 0, 120, 240 und 360 mV) bestimmt. Die chromatographischen Daten der einzelnen Catechine wurden jeweils bei der Spannung mit dem stärksten Signal ausgewertet (EGC und ECG bei 120 mV; GC, EGC, C und EC bei 240 mV). Die Nachweisgrenze lag für alle untersuchten Catechine bei 0,01 µmol/l Plasma.

Tab. 4: Verlauf des Elutionsgradienten bei der HPLC- Bestimmung von Catechinen aus dem Plasma

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
Vorlauf	0,9	100	0
3	0,9	80	20
9	0,9	60	40
11	0,9	0	100
16	0,9	0	100
16,5	0,9	100	0
18	0,9	100	0

Fließmittel A: Reinstwasser, Acetonitril, Trifluoressigsäure (920:80:1; v/v/v) pH 2,5;

Fließmittel B: Reinstwasser, Acetonitril, Trifluoressigsäure (650:350:1; v/v/v) pH 2,5

Die Quantifizierung der Catechine erfolgte mittels Standardkurven, wofür zunächst die Reinsubstanzen Catechin (C), Epicatechin (EC), Epicatechingallat (ECG), Epigallocatechin (EGC), Gallocatechin (GC) und Epigallocatechingallat (EGCG) in einer Pufferlösung (0,4 mol/l NaH_2PO_4 , 0,2 % Ascorbinsäure, 0,1 % Na-EDTA; pH 3,6) gelöst und durch Verdünnung mit der Pufferlösung eine Verdünnungsreihe hergestellt wurde. Durch Zugabe von 20 μl der jeweiligen Stammlösung zu 480 μl Albuminlösung (7 % bovines Serumalbumin, 0,9 % NaCl) wurden die Standards für die Erstellung von Eichgeraden mit Endkonzentrationen von 10; 7,5; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25 und 0,125 μmol Catechinen/l hergestellt. Diese Standardproben wurden hinsichtlich Extraktion und Messung wie die Plasmaproben aus dem Versuch behandelt. Die Identifizierung der Catechine in den Standard- bzw. Plasmaproben erfolgte anhand der Retentionszeiten der Reinsubstanzen.

In Abb. 8 ist beispielhaft die Eichgerade für Catechin dargestellt. Die Eichgeraden für sämtliche untersuchten Catechine wiesen ein Bestimmtheitsmaß von 0,99 auf.

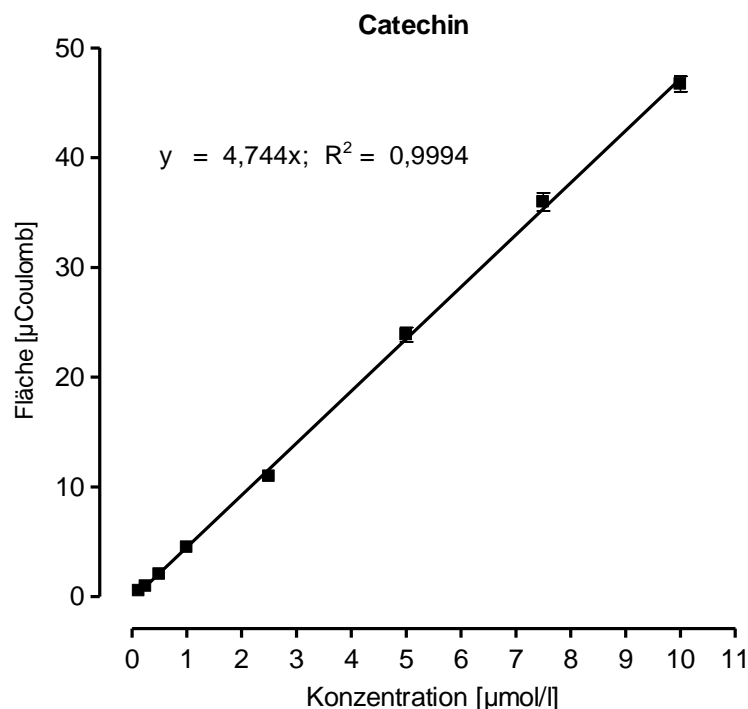


Abb. 8: Repräsentative Eichgerade von Catechin. Mittelwert \pm SEM, $n = 3$; R^2 = Bestimmtheitsmaß

3.2.2 Einfluss der Catechine auf die Gasbildung (V2)

Der Versuch zur Beurteilung möglicher Einflüsse von Catechinen aus dem GTE (Tab. 3) auf ruminale Fermentationsprozesse wurde mit dem Hohenheimer Futterwerttest (HFT) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein *in vitro*-Verfahren zur Ermittlung des Abbaus organischer Substanzen anhand der kumulativen Gasbildung (MENKE & STEINGAB, 1988).

Zur Herstellung des HFT-Inkubationsmediums wurde von zwei pansenfistulierten Rindern vor der Morgenfütterung über die Fistel unter Vermeidung von Luftbeimischung Pansensaft entnommen, welcher anschließend zur Entfernung der Grobpartikel durch ein Baumwolltuch gefiltert wurde. Der so gewonnene Pansensaft beider Tiere wurde anschließend gepoolt und bis zur Herstellung des Inkubationsmediums unter anaeroben Bedingungen (überschichtet mit CO₂) in einer vorgewärmten Thermosflasche bei 39 °C aufbewahrt. Die Herstellung des Inkubationsmediums sowie die Durchführung der Inkubationsversuche erfolgte jeweils nach den Vorgaben des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (NAUMANN & BASSLER, 1997). Die Zusammensetzung des Inkubationsmediums ist in Tab. B3 (Anhang B) aufgeführt.

Als Substrate für die Inkubation wurden die in Kapitel 3.1 beschriebenen Futtermittel MLF 18/3 bzw. Heu, auf 1 mm Siebdurchmesser gemahlen, eingesetzt. Je Substrat wurden zwei Dosierungen des GTE (20 bzw. 40 mg GTE/l Pansensaft) mit je sechs Wiederholungen in drei Durchgängen getestet. Die Inkubation erfolgte in einzelnen Glaskolben, welche 30 ml Inkubationsmedium, 200 mg Substrat (Heu bzw. MLF) sowie GTE in der entsprechenden Dosierung enthielten. Das Substrat sowie die Testsubstanz wurden am Tag zuvor eingewogen und bei 4 °C gelagert. Zur Vermeidung von Temperaturschwankungen wurden die Glaskolben eine Stunde vor dem Befüllen mit Inkubationsmedium bei 39 °C vorgewärmt. Die Ablesung der Gasmenge erfolgte nach 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 12; 24; 36 und 48 h. Parallel zu den Futterproben wurden auch Ansätze mit GTE, jedoch ohne Substratzusatz zur Erfassung einer möglichen Gasbildung aus der Testsubstanz durchgeführt (Blindwerte). Zur Validierung der einzelnen Durchgänge wurden jeweils zwei Futtermittelstandards (je 200 mg Heu bzw. Kraftfutter; Institut für Tierernährung, Universität Hohenheim, Stuttgart) in Doppelbestimmung inkubiert. Aus der dabei nach 24 h Inkubation gemessenen Gasbildung lassen sich gemäß nachfolgender Gleichungen Faktoren berechnen, die zur Validierung der Methode dienen:

$$Faktor_{Heu} = \frac{Sollwert^1}{gemessene Gasbildung des Heu - Standards}$$

$$Faktor_{Kraftfutter} = \frac{Sollwert^2}{gemessene Gasbildung des Kraftfutter - Standards}$$

¹ 49,61 ml/200 mg TM; ² 65,18 ml/200 mg TM (Gasbildungswerte nach 24 h)

Die Mittelwerte beider Faktoren mußten zwischen 0,9 und 1,1 liegen, andernfalls wurde der gesamte Durchgang wiederholt bzw. nicht für die Auswertung berücksichtigt.

Die Berechnung der gebildeten Gasmenge zu den jeweiligen Zeitpunkten erfolgte nach folgender Formel:

$$Gb_{(t)} = \frac{(V_{(t)} - V_0 - Gb0_{(t)}) \times \frac{F_H + F_{KF}}{2}}{W}$$

$Gb_{(t)}$ [ml/mg TM]	=	Gasbildung zum Zeitpunkt t
$V_{(t)}$ [ml]	=	Gesamtvolumen (Inkubationsmedium + Gas) zum Zeitpunkt t
V_0 [ml]	=	Volumen des Inkubationsmediums zum Zeitpunkt 0
$Gb0_{(t)}$ [ml]	=	mittlere Gasbildung der Blindwerte zum Zeitpunkt t
F_H	=	Faktor <i>Heu</i>
F_{KF}	=	Faktor <i>Kraftfutter</i>
W [mg]	=	Substrat-Einwaage (TM)

3.2.3 Ruminaler Abbau von Catechinen (V3)

Der Versuch zum Abbau von Catechinen aus dem GTE in den Vormägen wurde analog V2 mit dem HFT durchgeführt (s. 3.2.2). Die Herstellung des Inkubationsmediums und Handhabung der Kolben erfolgte ebenfalls wie in V2. Als Substrat wurde ein Gemisch aus MLF 18/3 und Heu im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Die Messung des Abbaus von Catechinen erfolgte bei zwei Dosierungen des GTE (0 und 160 mg/l) in vier Durchgängen (= Wiederholungen). Die Kolben wurden nach 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 12 und 24 h entnommen. Dabei wurde der gesamte Kolbeninhalt in Probenröhrchen überführt und sofort bei -18 °C zur Unterbindung weiterer mikrobieller Aktivität eingefroren. Zum Schutz der Catechine vor Oxidations- und Abbaureaktionen wurden analog zur Behandlung der Plasmaproben auch der entnommene Kolbeninhalt mit einer Stabilisierungslösung (600 µl/30 ml Probe) versetzt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert (s. 3.2.1).

Des Weiteren wurden zur Erfassung der Stabilität der im GTE enthaltenen Catechine unter den gegebenen Inkubationsbedingungen vier Durchgänge mit inaktiviertem Pansensaft durchgeführt. Dazu wurde der Pansensaft unmittelbar nach der Entnahme aus dem Pansen 20 min in einem Becherglas unter ständigem Rühren gekocht und zur Herstellung des

Inkubationsmediums danach wieder auf 39 °C abgekühlt. Analog zu V2 wurden auch bei diesem Versuch die Gasbildung des Heu- sowie Kraftfutterstandards erfasst.

Bestimmung der Catechine im Pansensaft

Zur Aufbereitung der Pansensaftproben wurden diese zunächst bei Zimmertemperatur aufgetaut, anschließend 15 min bei 4 °C und 2.000 g zentrifugiert und der dabei erhaltene Überstand bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung (mind. 24 h) eingefroren. Nach erneutem Auftauen und Zentrifugieren wurden 500 µl der Probe mit 1 ml Ethylacetat versetzt, 15 min gemischt (Reagenzglas-Rotator) und erneut 20 min bei 4 °C und 2.000 g zentrifugiert. 800 µl des Überstandes wurden in ein Glasröhrchen überführt. Die weitere Extraktion erfolgte analog den Plasmaproben (s. 3.2.1).

Die Bestimmung der Catechine (EC, EGC, EGCG und GC) wurde mittels HPLC analog den Plasmaproben durchgeführt (s. 3.2.1). Dabei unterschieden sich allerdings Laufzeit und Gradientenelution (Tab. 5).

Tab. 5: Verlauf des Elutionsgradienten bei der HPLC- Bestimmung von Catechinen aus Pansensaft

Zeit [min]	Flussrate [ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
Vorlauf	0,9	100	0
3	0,9	80	20
9	0,9	60	40
11	0,9	0	100
16	0,9	0	100
16,5	0,9	20	80
18	0,9	20	80
20	0,9	80	20
20,1	0,9	95	5
20,2	0,9	100	0
30,1	0,9	100	0

Gradient A: Reinstwasser, Acetonitril, Trifluoressigsäure (920:80:1, v/v/v) pH 2,5;

Gradient B: Reinstwasser, Acetonitril, Trifluoressigsäure (650:350:1, v/v/v) pH 2,5

Im Wesentlichen entsprach das Vorgehen zur Quantifizierung der Catechine aus dem HFT-Inkubationsmedium dem Vorgehen bei der Analyse der Plasmaproben (s. 3.2.1). Die Analyse der Catechine beschränkte sich hier allerdings auf die im GTE quantitativ bedeutendsten vier Catechine: EGCG, EGC, EC und GC. Auf Grund unterschiedlicher Gehalte dieser Catechine im GTE (Tab. 3) wurden die Standards für die Erstellung der Eichgeraden in unterschiedlichen Endkonzentrationen hergestellt (EGC, EGCG: 100; 50; 25; 12,5; 6,25;

3,123 und 1,56 μmol Catechin/l; EC, GC: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56 und 0,78 μmol Catechin/l). Abweichend von der Beschreibung der Plasmaanalysen wurde anstelle einer Albuminlösung zur Herstellung der Standardreihen das Inkubationsmedium aus dem HFT verwendet. Die Standardproben wurden gleich den Proben aus dem HFT-Versuch behandelt. Die Identifizierung der Catechine in den Proben sowie den Standards erfolgte anhand der Retentionszeiten.

In Abb. 9 ist beispielhaft die Eichgerade für EGCG dargestellt. Die Eichgeraden für sämtliche untersuchten Catechine wiesen ein Bestimmtheitsmaß von 0,99 auf.

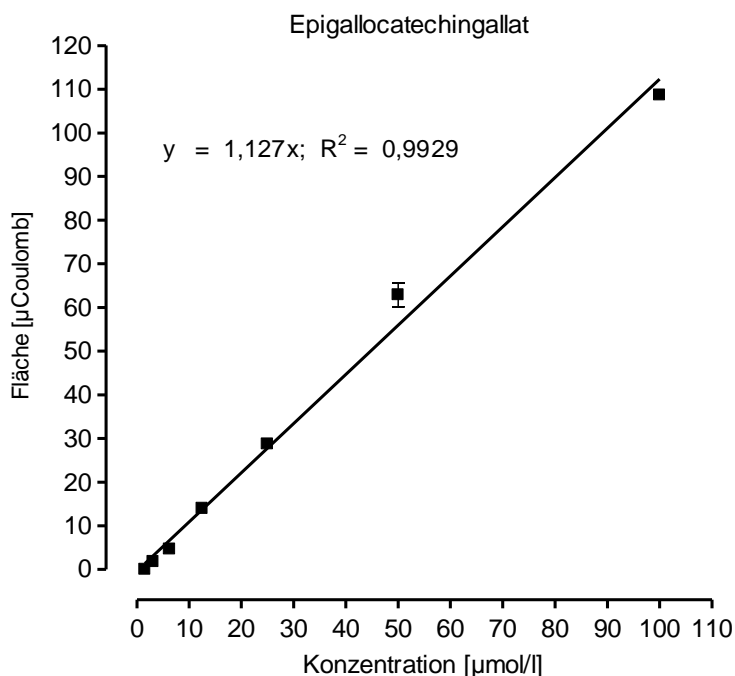


Abb. 9: Repräsentative Eichgerade von Epigallocatechingallat. Mittelwert \pm SEM, $n = 3$; R^2 = Bestimmtheitsmaß

3.3 Quercetinexperimente

Die Bioverfügbarkeit von Quercetin nach intraruminaler Applikation verschiedener Quercetinquellen (Aglycon, Rutin) wurde bereits in einer früheren Studie untersucht (BERGER et al., 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ergänzend dazu die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus „verschiedenen Applikationsformen“ bzw. natürlichen Quellen (Quercetin-angereichertes Futterfett, verschiedene Zwiebelextrakte) untersucht.

3.3.1 Einfluss von Futterfett auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin (V4 + V5)

Als Fett wurde ein handelsübliches Futterfett für Kühe (Bergafat F-100) mit Quercetindihydrat angereichert (finale Konzentration 4 % Quercetinäquivalente). Dies geschah mittels CO₂-unterstütztem Hochdrucksprühverfahren durch die Firma Uelzena (Uelzen). Zur Verringerung des Volumens des dabei anfallenden feinen Pulvers (Quercetin-angereichertes Fettpulver = QFP) wurden daraus Pellets (Ø ~ 0,5 mm) gepresst (QPel), wodurch eine Volumenreduzierung auf ein Drittel der Ausgangssubstanz erreicht und damit eine Dosierung von 50 mg Quercetinäquivalente/kg KM ermöglicht wurde. Des Weiteren wurden in diesem Versuch Quercetin-Aglycon + Quercetin-freies Fettpulver (FP) appliziert, um mögliche Einflüsse des Fettes auf die Absorption von Quercetin im Pansen per se feststellen zu können. In einem zweiten Versuch (V5) wurde neben den oben beschriebenen QPel auch das QFP eingesetzt, um mögliche Effekte der Konfektionierung zu erfassen. In diesem Versuch musste die Dosierung von Quercetin allerdings auf 20 mg Quercetinäquivalente/kg KM beschränkt werden, da bei Applikation der pulverförmigen Konfektion eine höhere Dosierung nicht möglich war.

Die Versuche zur Applikation von Quercetin in Kombination mit einem kommerziellen Futterfett für Wiederkäuer wurden als kontrollierte, randomisierte Interventionsstudien im fünf- bzw. dreiarmligen (V4 bzw. V5) Crossover-Design durchgeführt. Dabei erhielt jedes Tier pro Behandlung einmalig eine der in den Abb. 10 bzw. 11 aufgeführten Testsubstanzen i.r. mit der Morgenfütterung in entsprechender Dosierung (V4: 50 mg, V5: 20 mg Quercetinäquivalente/kg KM) appliziert. Die Auswaschphase zwischen den Behandlungen betrug zwei Tage, wodurch eine weitgehende Eliminierung der Testsubstanzen aus dem Organismus gewährleistet wurde. Rutin und Quercetin wurden zur Erleichterung der Applikation in 500 ml Kochsalzlösung (0,9 %) suspendiert.

Die verschiedenen Fett-Applikationen wurden jeweils als Festsubstanz (Pulver oder Pellets) manuell in den Pansen verbracht. Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Gruppen, wurden anschließend ebenfalls 500 ml Kochsalzlösung appliziert. Die Kontrolle (K) in V4 bestand ausschließlich aus 500 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %).

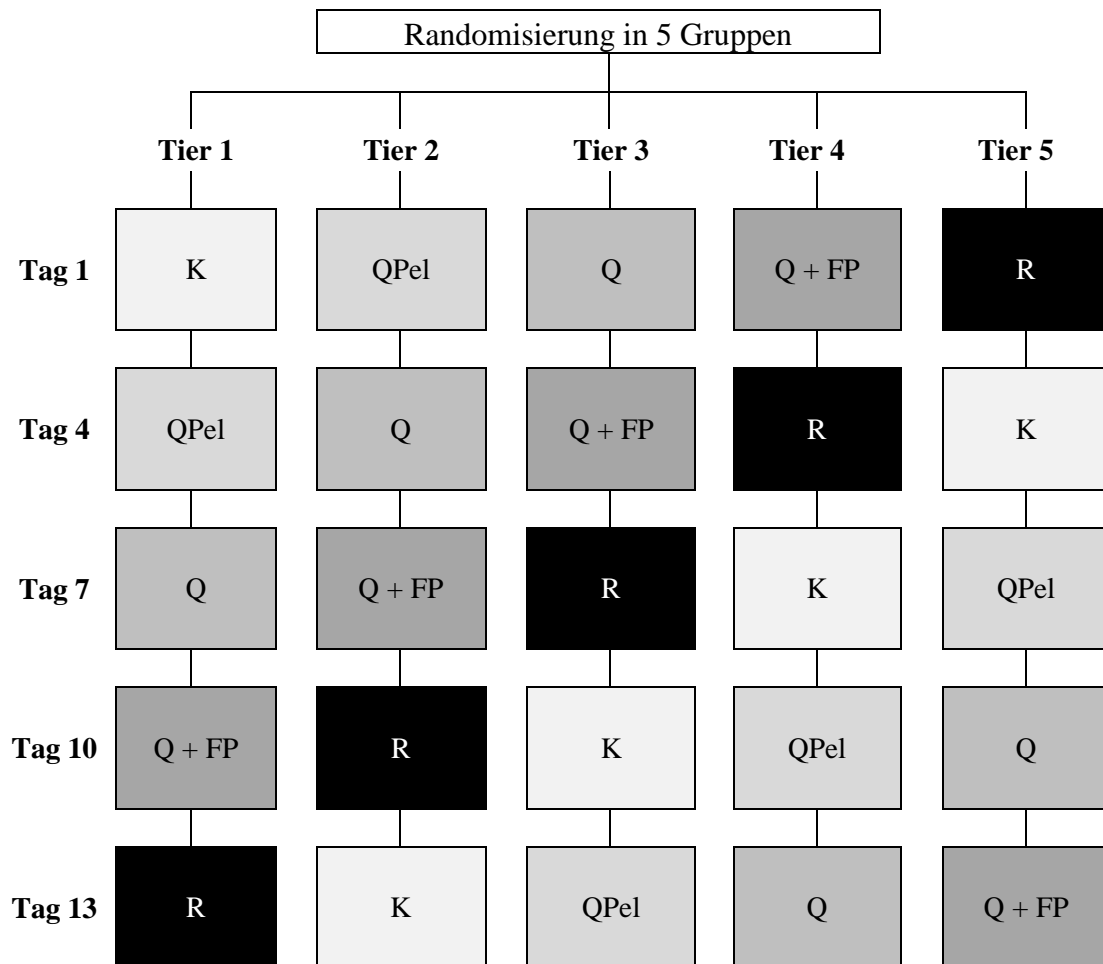


Abb. 10: Versuchsaufbau V4 in fünfarmigem Crossover- Design. K = Kontrolle, QPel = Quercetin-angereicherte Fettpellets, Q = Quercetin-Aglycon, FP = Fettpulver, R = Rutin

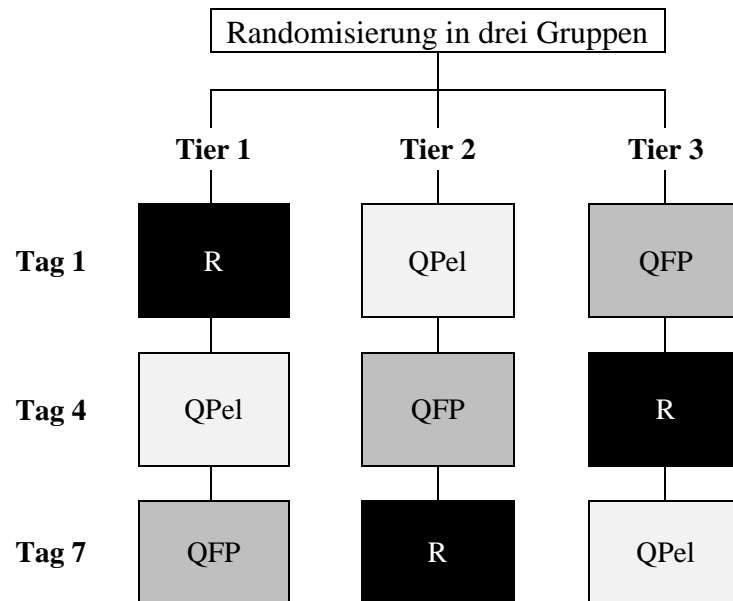


Abb. 11: Versuchsaufbau V5 in dreiarbigem Crossover-Design. R = Rutin, QPel = Quercetin-angereicherte Fettpellets, QFP = Quercetin-angereichertes Fettpulver

Die Blutentnahme (9 ml) in V4 erfolgte kurz vor (= Zeitpunkt 0) sowie 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 8; 10; 12; 14; 16; 18; 20; 22 und 24 h nach Applikation der Testsubstanzen. In V5 erfolgte die Blutentnahme ebenfalls kurz vor, sowie 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 12 und 24 h nach Applikation der Testsubstanzen. Alle Blutproben wurden unmittelbar nach ihrer Entnahme zur Plasmagewinnung 10 min. bei 4 °C und 1.100 g in einer Kühl-Zentrifuge zentrifugiert und im Anschluss das Plasma in Eppendorf-Cups aliquotiert (3 x 1 ml). Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Zwiebelschalenextrakt und Zwiebelextrakt (V6)

Untersuchungen von BERGER et al. (2012) haben ergeben, dass die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem Glucorhamnosid Rutin beim Rind 8-fach höher als aus dem Quercetin-Aglycon ist. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in einem weiteren Versuch (V6) die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Zwiebelextrakt (ZE) sowie aus Zwiebelschalenextrakt (ZSE) untersucht, wobei ersteres reich an Quercetin-Glycosiden und letzteres reich an Quercetin-Aglycon ist (Tab. 6). Dabei handelt es sich um natürliche Produkte, deren Einsatz als Futtermittelzusatz in der Tierernährung denkbar ist.

Tab. 6: Quercetingehalte im Zwiebel- und Zwiebelschalenextrakt

	Gehalte [μmol Quercetinäquivalente/g]	
	Zwiebelextrakt	Zwiebelschalenextrakt
Quercetin-Aglycon	436	843
Quercetin-Monoglycoside	301	2
Quercetin-Diglycoside	98	0,3

Angaben nach HPLC-Analytik durch IEL Lebensmitteltechnologie, Bonn (Dr. Benno Zimmermann)

In V6 erhielt jedes Tier entsprechend einem kontrollierten randomisierten Crossover-Design pro Behandlung eine der Testsubstanzen (Abb. 12; 50 mg Quercetinäquivalente/kg KM) via Pansenfistel einmalig mit der Morgenfütterung. Die Testsubstanzen wurden dazu in 500 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) suspendiert. Mit einer Auswaschungsphase von zwei Tagen zwischen den Behandlungen konnte eine nahezu vollständige Eliminierung der Testsubstanzen aus dem Organismus gewährleistet werden.

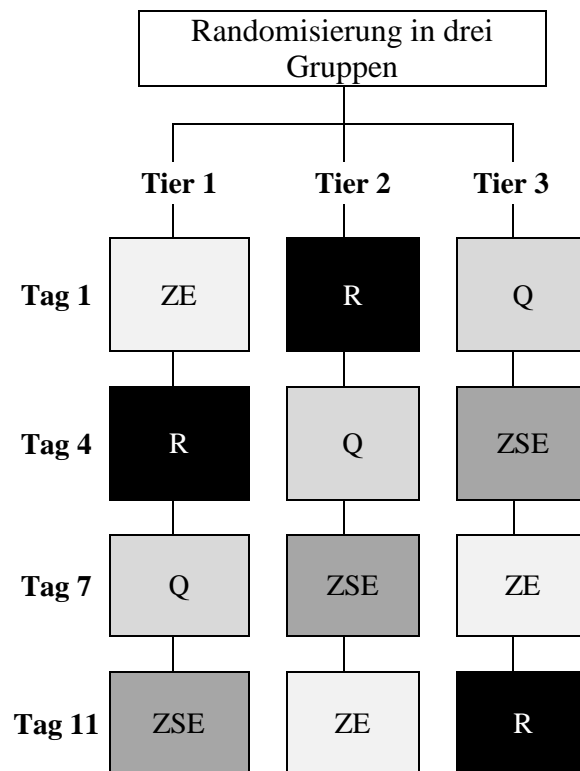


Abb. 12: Versuchsdesign V6 in dreiarmligem Crossover- Design. ZE = Zwiebelextrakt, R = Rutin, Q = Quercetin-Aglycon, ZSE = Zwiebelschalenextrakt

Die Blutentnahme (9 ml) in V6 erfolgte kurz vor (= Zeitpunkt 0) sowie 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 8; 12 und 24 h nach Applikation der Testsubstanzen. Alle Blutproben wurden unmittelbar nach ihrer zur Plasmagewinnung 10 min bei 4 °C und 1.100 g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert und das gewonnene Plasma im Anschluss in Eppendorf-Cups aliquotiert (3 x 1 ml). Bis zur Analyse wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

Bestimmung der Flavonole im Plasma

Die Extraktion der Flavonole (Quercetin, Kaempferol, Isorhamnetin, Tamarixetin) aus dem Plasma erfolgte nach modifizierter Methode von BERGER et al. (2012). Nach Auftauen der Probe bei 37 °C im Wasserbad wurden zu 980 µl Plasma 20 µl einer Rhamnetin-Methanol-Lösung (Rhamnetin: 50 µg/ml) als internen Standard hinzugefügt. Durch Zusatz von 130 µl Essigsäure (0,583 mol/l) wurde ein pH-Wert von ca. 5,0 eingestellt. Dem Gemisch wurden 75 µl β -Glucuronidase mit Sulfatase-Aktivität (Typ H-1, finale Aktivitäten 7.300/130 U/ml Glucuronidase/Sulfatase) zur Spaltung von im Plasma vorliegenden Flavonol-Konjugaten zugefügt. Das Gemisch wurde anschließend 60 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Aktivität der zugesetzten Enzyme wurde durch Zugabe von 3 ml Aceton gestoppt und der Überstand 20 min intensiv durchmischt (Horizontalschüttler). Nach 45-minütiger Zentrifugation (4 °C, 2.000 g) wurde die Probe bis zur vollständigen Trockene unter Vakuum bei 45 °C eingedampft. Der Rückstand wurde in 200 µl Methanol in einem Ultraschallbad (15 min, 37 °C) gelöst. Anschließend wurden der Lösung 77,5 µl Reinstwasser und 22,5 µl Salzsäure (10 mol/l) hinzugefügt, gründlich durchmischt und 10 min bei 8.000 g zentrifugiert. Vom erhaltenen Überstand wurden 200 µl für die HPLC-Analyse verwendet.

Die Bestimmung von Quercetin und seinen Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur (Kaempferol, Isorhamnetin, Tamarixetin) mittels HPLC erfolgte nach der Methode von BERGER et al. (2012). Alle dafür verwendeten Geräte sind im Anhang A aufgeführt.

Zunächst wurden 30 µl der Probe über einen Autosampler auf eine reversed-phase Trennsäule mit vorgeschalteter Vorsäule injiziert. Das Fließmittel (pH = 2,9) setzte sich aus einem Phosphatpuffer (Natriumhydrogenphosphat-Lösung, 25 mmol/l, pH = 2,4), Acetonitril und Methanol im Verhältnis 68:27:5 (v/v/v) zusammen. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die Nachsäulenderivatisierung zur Komplexbildung der Flavonole mit Al^{3+} erfolgte in einem Kapillarreaktor mittels einer methanolischen Aluminiumnitratlsung (1 mol/l Aluminiumnitrat in 7,2 %iger Essigsäure), welche dem Eluent mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min über ein T-Mischstck zugeführt wurde. Reaktor und Säule

wurden auf 30 °C in einem Säulenofen temperiert. Die Detektion der Flavonole erfolgte mittels Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 422 nm und einer Emissionswellenlänge von 485 nm. Die Identifikation des Quercetins und seiner Metaboliten erfolgte anhand der Retentionszeiten entsprechender Referenzstandards (Anhang A). Die detektierten Peaks wurden mit Hilfe der Borwin Chromatography Software (Version 1.50) ausgewertet.

Zur Herstellung von Kalibrationsreihen für Quercetin, Kaempferol, Isorhamnetin und Tamarixetin wurde eine methanolische Standardlösung angesetzt, die alle genannten Flavonole in einer Konzentration von 125 µg/ml enthielt. Diese wurde schrittweise bis zu einer Konzentration von 2,44 µg/ml verdünnt, um einen ausreichenden Konzentrationsbereich abzudecken. Von den verschiedenen Standardlösungen wurden jeweils 20 µl sowie 20 µl einer methanolischen Rhamnetin-Lösung (s.o.) zu 960 µl einer wässrigen Serumalbumin-lösung (7 % bovines Serumalbumin, 0,9 % NaCl) hinzugegeben. Die weitere Aufarbeitung dieser Standardproben erfolgte analog zur Behandlung der untersuchten Plasmaproben (s.o.).

Die Quantifizierung der in den Proben detektierten Flavonole erfolgte im Fall von Quercetin und Isorhamnetin anhand der relativen Peakflächen (Fläche Quercetin- bzw. Isorhamnetin-Peaks dividiert durch Fläche des Rhamnetin-Peaks). Die Berechnung der Kaempferol- und Tamarixetin-Gehalte erfolgte hingegen anhand der absoluten Peakflächen, da diese beiden Flavonole im Unterschied zu Quercetin, Isorhamnetin und Rhamnetin eine hohe Stabilität während der Probenaufarbeitung und –messung aufweisen und daher der verwendete interne Standard (Rhamnetin) zur Quantifizierung nicht geeignet ist. In Abb. 13 sind die für die Auswertung der Plasmaproben verwendeten Kalibrierungsgeraden dargestellt. Die Berechnung der Eichgeradensteigungen wurde mit GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Version 4.01, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt. Die Wiederfindung der Flavonole wurde anhand des Vergleichs der mit methanolischen sowie Serumalbuminen Standards erstellten Eichgeraden berechnet. Dabei wurde der jeweilige Wert des methanolischen Standards 100 % gesetzt. Die Wiederfindung von Quercetin, Kaempferol, Isorhamnetin und Tamarixetin lag bei 92 ± 2 %. Die Nachweisgrenze lag bei 0,01 µmol/l Plasma.

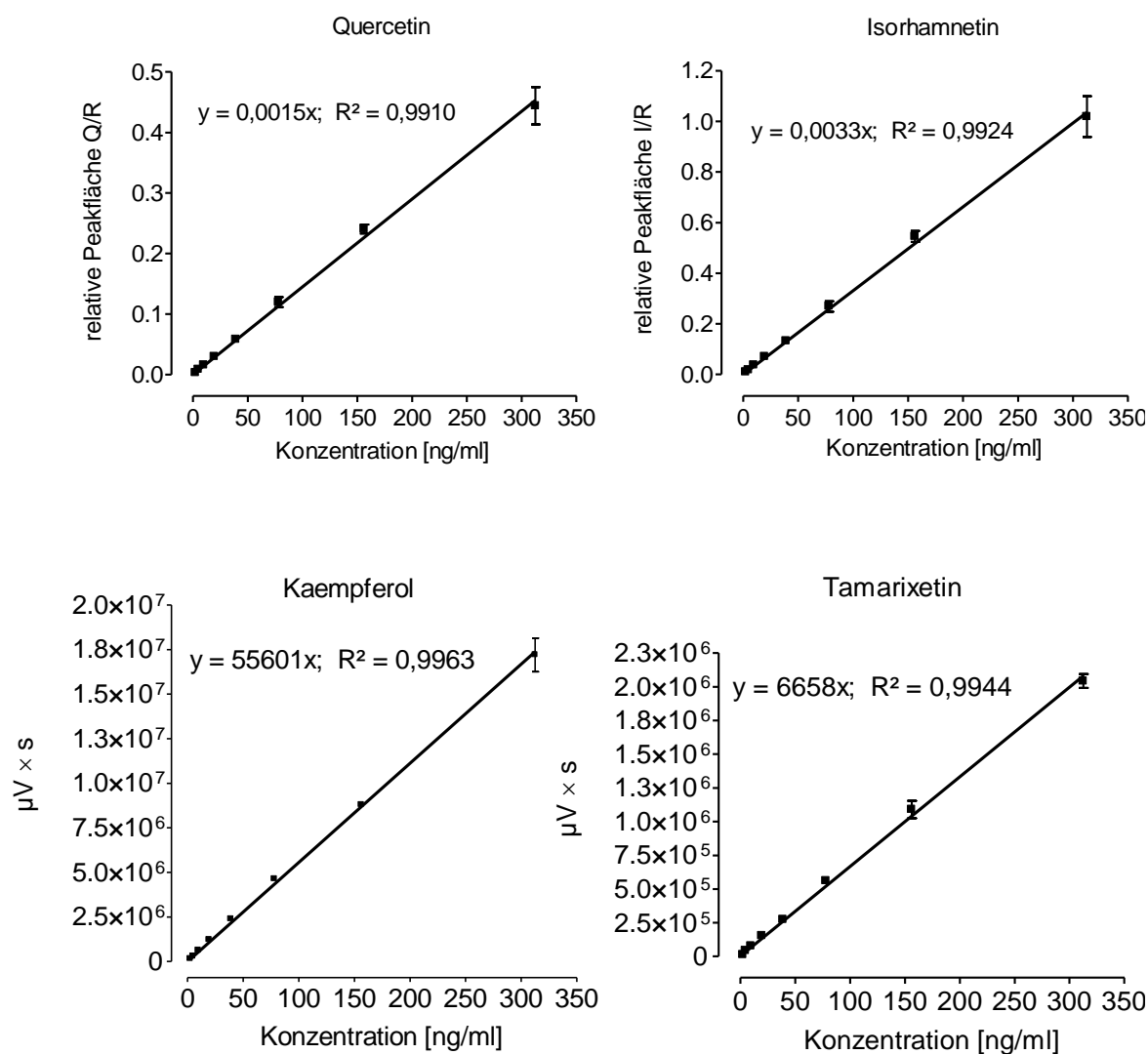


Abb. 13: Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von Quercetin (Q), Kaempferol, Isorhamnetin (I) und Tamarixetin. R = Rhamnetin (interner Standard); Mittelwerte \pm SEM, $n = 3$; R^2 = Bestimmtheitsmaß

Pharmakokinetische Parameter

Zur Berechnung der systemischen Verfügbarkeit (= Bioverfügbarkeit) von Quercetin wurde unter Verwendung der Gesamtflavonol-Konzentrationen (Quercetin + Kaempferol + Isorhamnetin + Tamarixetin) die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC = Area Under the Curve) vom Zeitpunkt Null bis 24 h nach der Applikation herangezogen. Die AUC verhält sich proportional zur in den Kreislauf gelangten Menge und wird im pharmakologischen Sinne der Bioverfügbarkeit einer Substanz gleichgestellt. Des Weiteren wurde die maximale Plasmakonzentration (c_{\max}) und der Zeitpunkt bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration (t_{\max}) aus den Konzentrations-Zeitverläufen ermittelt.

Die Berechnung und graphische Darstellung der einzelnen Parameter erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4. Bei der Auswertung aller Bioverfügbarkeitsdaten wurde die zum Zeitpunkt Null gemessene Konzentration der Gesamtflavonole als Basalwert abgezogen.

3.4 Statistik

In Vivo- Versuche

Die statistische Auswertung der pharmakokinetischen Parameter AUC_{0-24} , c_{max} und t_{max} aus den Quercetin-Bioverfügbarkeitsstudien (V4 – V6) erfolgte als gemischtes Modell mit einfaktorieller ANOVA (Varianzanalyse) und anschließendem Mittelwertsvergleich mit dem Post-hoc Test nach Tukey-Kramer mittels SAS (SAS Institute, Inc., Version 9.2). Dabei wurde die Normalverteilung der Daten approximativ angenommen und die Signifikanzgrenze auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

Die Ergebnisse sind in Form von Mittelwerten mit den dazugehörigen Standardfehlern (SEM) dargestellt.

In Vitro- Versuche

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus dem Versuch zum Einfluss auf die Gasbildung von Catechinen (V2) erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA, wobei als feste Größen die Gasbildung (ml/g TM) sowie die Zeitpunkte, an denen die Gasbildung erfasst wurde, in das Modell eingingen. Als post-hoc Test wurde der Bonferroni- Test angewandt. Die Signifikanzgrenze wurde bei $p \leq 0,05$ definiert.

Die Ergebnisse beider *in vitro* Versuche (V2 + V3) sind in Form von Mittelwerten mit den dazugehörigen Standardfehlern (SEM) dargestellt. Die Regressionsgeraden für die Bestimmung der Eichgeraden für die Versuche zum ruminalen Abbau der Catechine sowie die graphische Darstellung sämtlicher Ergebnisse erfolgte mittels GraphPad Prism 4.

4. Ergebnisse

4.1 Catechinexperimente

4.1.1 Versuch zur Bioverfügbarkeit von Catechinen (V1)

In Abb. 14 sind repräsentative HPLC Chromatogramme einer Plasmaprobe 2,5 h nach i.r. Applikation von 50 mg GTE/kg KM (A), derselben mit Standard (1 $\mu\text{mol/l}$) gespikten Plasmaprobe (B) sowie der zum Spiken verwendeten Standardlösung (C) dargestellt. Daraus geht hervor, dass mit Ausnahme von Catechin zu keinem Zeitpunkt Originalsubstanzen in den Plasmaproben wieder zu finden waren. Neben den unbekannten Peaks 1 bis 7 wurden in der gespikten Probe weitere unbekannte Peaks detektiert, die nicht in die Auswertung einbezogen wurden (Abb. 14). In den Plasmaproben der Kontrollgruppe, d.h. ohne Applikation von GTE, wurden keine Peaks detektiert (ohne Abb.). In Tab. 7 sind die Retentionszeiten und Flächen der ausgewerteten Peaks zusammengefasst.

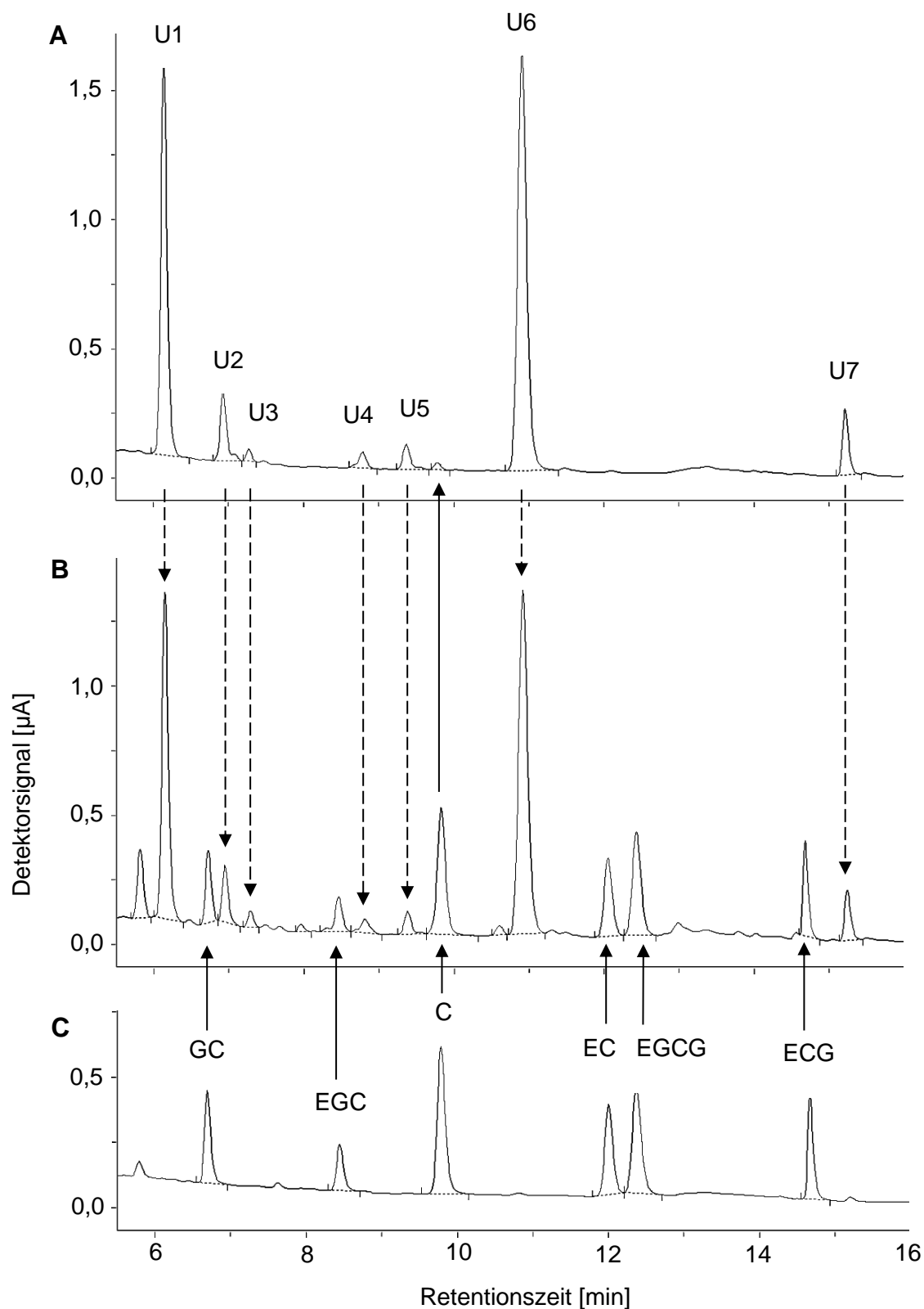


Abb. 14: Repräsentative HPLC Chromatogramme einer Plasmaprobe 2,5 h nach intraruminaler Applikation von 50 mg Grünteeextrakt/kg KM (A), derselben mit Standard (1 $\mu\text{mol/l}$) gespikten Probe (B) sowie des Standards (1 $\mu\text{mol/l}$, C). GC = Gallocatechin, EGC = Epigallocatechin, C = Catechin, EC = Epicatechin, ECGC = Epigallocatechingallat, ECG = Epicatechingallat, U = unbekannter Peak

Tab. 7: Retentionszeiten und Peak-Flächen der detektierten Peaks^{*)} einer Plasmaprobe 2,5 h nach intraruminaler Applikation von 50 mg Grünteeextrakt/kg KM (**A**), derselben mit Standard (1 µmol/l Plasma) gespikten Probe (**B**) sowie des Standards (1 µmol/l Plasma, **C**)

Peak	Retentionszeit [min]	Peak-Fläche [µC]
A		
1	6,13	8,98
2	6,93	1,67
3	7,27	0,23
4	8,78	0,46
5	9,37	0,70
C	9,78	0,17
6	10,91	14,02
7	15,20	1,47
B		
1	5,82	1,52
2	6,14	7,57
GC	6,73	1,55
4	6,94	1,22
5	7,28	0,33
6	7,96	0,14
EGC	8,46	0,94
8	8,81	0,44
9	9,38	0,59
C	9,83	3,83
11	10,60	0,21
12	10,90	11,40
EC	12,10	2,28
EGCG	12,40	3,28
ECG	14,70	1,77
16	15,20	1,11
C		
GC	6,69	2,11
EGC	8,44	1,15
C	9,78	4,26
EC	12,00	2,59
EGCG	12,37	3,49
ECG	14,67	2,07

^{*)} dazugehörige Chromatogramme s. Abb. 14; *C* = Catechin, *EC* = Epicatechin, *ECG* = Epicatechingallat, *EGC* = Epigallocatechin, *EGCG* = Epigallocatechingallat, *GC* = Gallocatechin

4.1.2 Ruminaler Abbau von Catechinen (V3)

Abb. 15 zeigt die Konzentrations-Zeitverläufe der aus dem HFT-Inkubationsmedium bestimmten Konzentrationen von GC, EGC, EC und EGCG (Initialkonzentrationen: 27, 100, 35 und 100 $\mu\text{mol/l}$). Dabei zeigte sich ein Abfall der Konzentrationen von EGCG, EGC und GC über den gesamten Inkubationszeitraum. Die Konzentrationen der quantitativ wichtigsten im GTE enthaltenen und bestimmten Catechine lagen nach 24 h Inkubationszeit im Bereich der Nachweisgrenze.

Das Inset der Abb. 15 zeigt die Konzentrationsverläufe der vier dominanten im GTE enthaltenen Catechine (EGCG + EGC + EC + GC) bei Verwendung von aktivem bzw. inaktiviertem Inkubationsmedium. Nach einem moderaten Rückgang der Konzentrationen bei Verwendung beider Medien in den ersten 2 h fielen die Konzentrationen der Catechine im inaktivierten Medium nicht weiter ab, wohingegen in aktivem Medium ein weiterer konstanter Abfall der Catechin-Konzentrationen bis in den Bereich der Nachweisgrenze erfolgte.

Erwähnenswert ist ferner, dass die im Inkubationsmedium gemessenen Startkonzentrationen von den nach Herstellerangaben berechneten Initialkonzentrationen abweichen. Dies ist möglicherweise durch Ungenauigkeiten der Konzentrationsangaben im GTE durch den Hersteller begründet. Allerdings führt dies nicht zu einer fehlerhaften Interpretation der Ergebnisse.

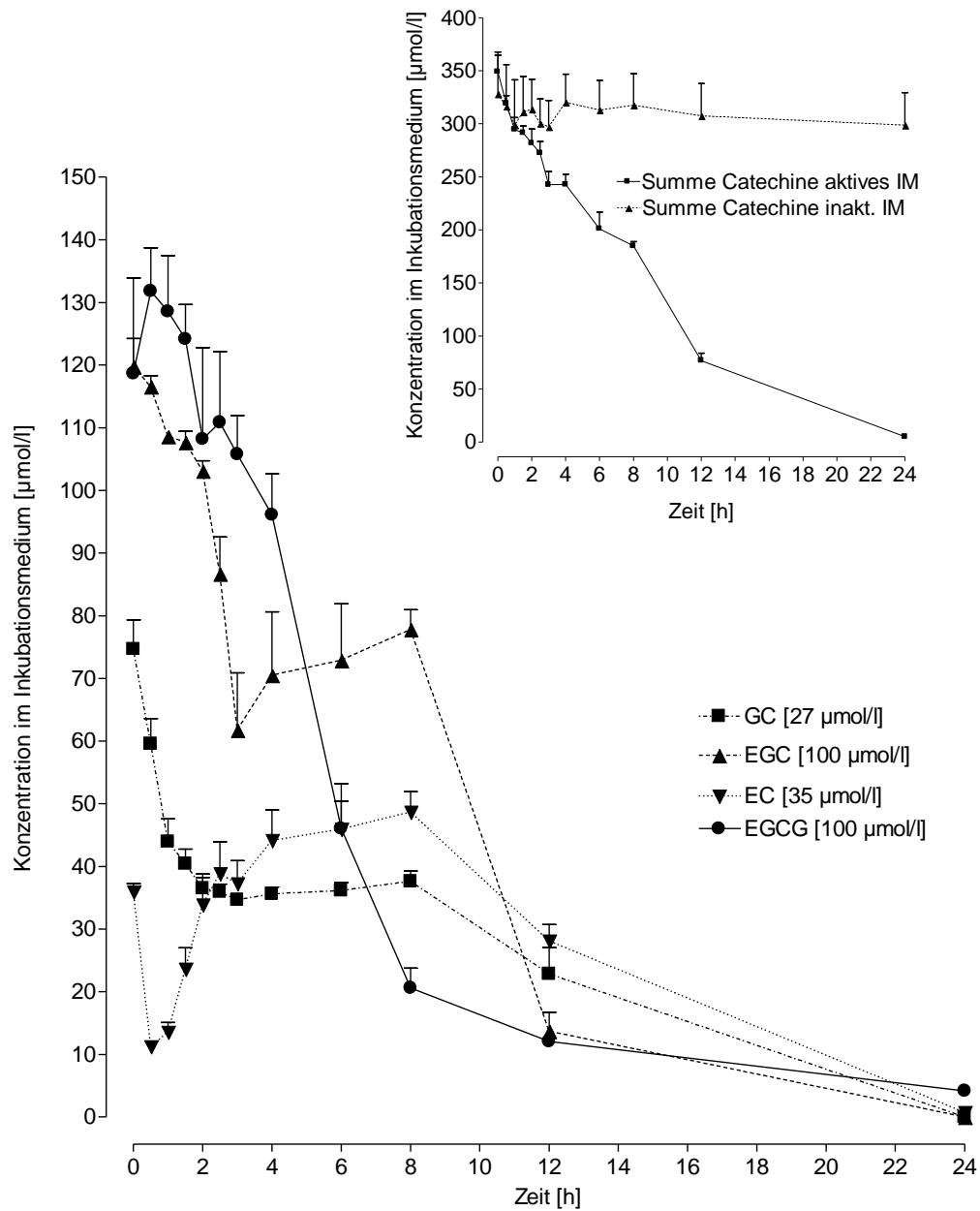


Abb. 15: Zeitabhängiger Verlauf der Konzentrationen von Gallocatechin (GC), Epigallocatechin (EGC), Epicatechin (EC) und Epigallocatechingallat (EGCG) im Inkubationsmedium (initiale Konzentrationen in eckigen Klammern). Mittelwerte + SEM, $n = 5$. **Inset:** Zeitverläufe der Catechin-Konzentrationen bei Verwendung von aktivem vs. inaktiviertem Inkubationsmedium (IM). Mittelwerte + SEM, $n = 5$ bzw. 4 (aktiv bzw. inaktiviert)

4.1.3 Einfluss von Catechinen auf die Gasbildung (V2)

In Abb. 16 ist der Einfluss von 20 bzw. 40 mg GTE/l Inkubationsmedium auf die kumulative Gasbildung über eine Inkubationsperiode von 48 h mit MLF (A) und Heu (B) dargestellt. Die Kontrollversuche dazu wurden jeweils ohne Zusatz des GTE durchgeführt. Unter allen Bedingungen zeigte sich ein kurvenlinearer Verlauf der kumulativen Gasbildung mit klarer Tendenz zur Plateaubildung. Weder der Zusatz von 20 noch von 40 mg GTE/l Inkubationsmedium hatte dabei einen Einfluss auf die kumulative Gasbildung. Dies gilt sowohl bei Verwendung von MLF als auch bei Heu als Substrat.

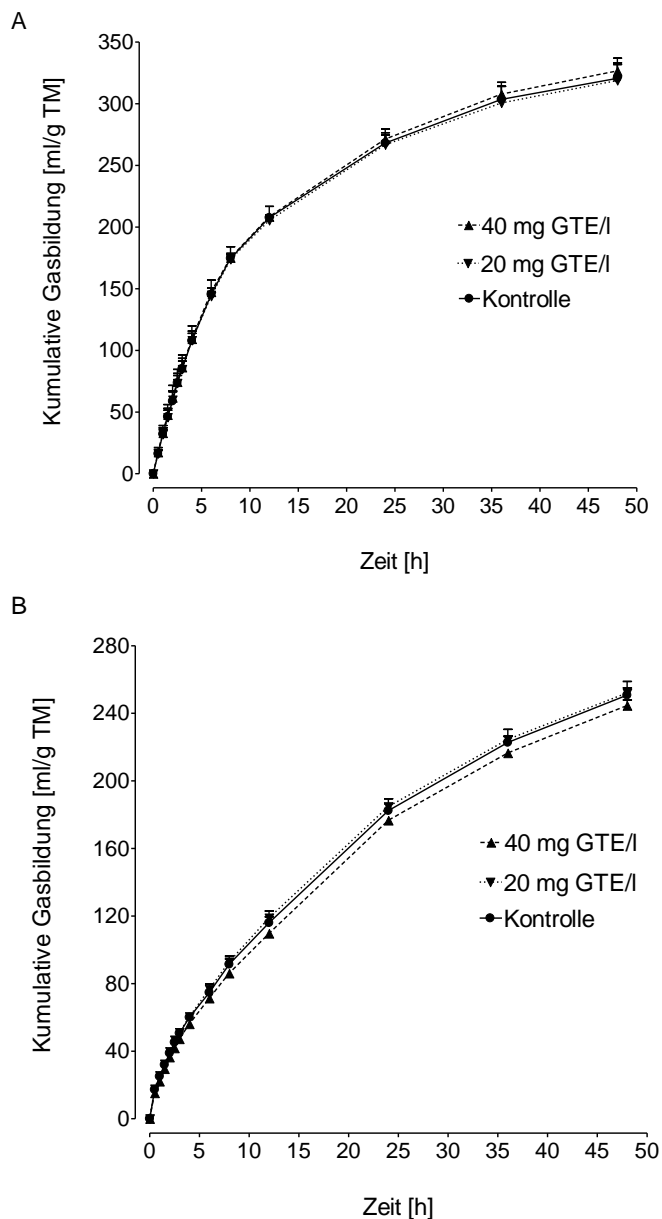


Abb. 16: Zeitverlauf der kumulativen Gasbildung ohne (Kontrolle) bzw. mit Zusatz von 20 oder 40 mg Grüntee-extrakt (GTE)/l durch Inkubation in Milchleistungsfutter (MLF, A) und Heu (B). Mittelwerte + SEM, n = 4 (MLF) n = 3 (Heu)

4.2 Quercetinexperimente

4.2.1 Einfluss von Futterfett auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin (V4 + V5)

In Abb. 17 sind die Plasmakonzentrations-Zeitverläufe der Gesamtflavonole nach i.r. Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM in Form von Quercetin-Aglycon (Q), Rutin (R), Quercetin-angereicherten Fettpellets (QPel) sowie Q + Quercetin-freies Fettpulver (Q + FP) dargestellt. Tab. 8 gibt die aus diesen Konzentrations-Zeitverläufen berechneten pharmakokinetischen Parameter wieder.

Unter Kontrollbedingungen sowie bei Einsatz von QPel erfolgte kein nennenswerter Anstieg der Gesamtflavonol-Konzentrationen im Plasma (Abb. 17, Tab. 8) über den gesamten Versuchszeitraum. Bei Verwendung von Rutin bzw. Quercetin als Quercetinquelle ergaben sich dagegen analoge Verläufe wie bei den früheren Untersuchungen von BERGER et al. (2012). Die Applikation von Rutin resultierte in einem raschen Anstieg der Gesamtflavonol-Konzentration im Plasma mit einem Maximum nach ca. 1 h (Abb. 17, Tab. 8), wohingegen bei Verwendung von Quercetin nur ein wesentlich geringerer Anstieg der Plasmakonzentration, mit einem Maximum ebenfalls nach ca. 1 h, zu verzeichnen war (Abb. 17, Tab. 8). Nach Erreichen des Maximums zeigten die entsprechenden Konzentrations-Zeitverläufe von Rutin und Quercetin einen kontinuierlichen Rückgang der jeweiligen Plasmakonzentration, wobei bereits nach 8 h sehr niedrige Konzentrationen (z.T. im Bereich der Nachweisgrenze) auftraten. Der Zeitverlauf der Gesamtflavonol-Konzentrationen im Plasma nach Applikation von Q + FP ist mit dem Verlauf nach Applikation von Quercetin vergleichbar (Abb. 17).

Die AUC_{0-24} und die maximale Konzentration der Gesamtflavonole im Plasma waren nach der Applikation von Rutin höher im Vergleich zu allen anderen Applikationen (Q, QPel, Q + FP, K), die sich untereinander nicht unterschieden (Tab. 8).

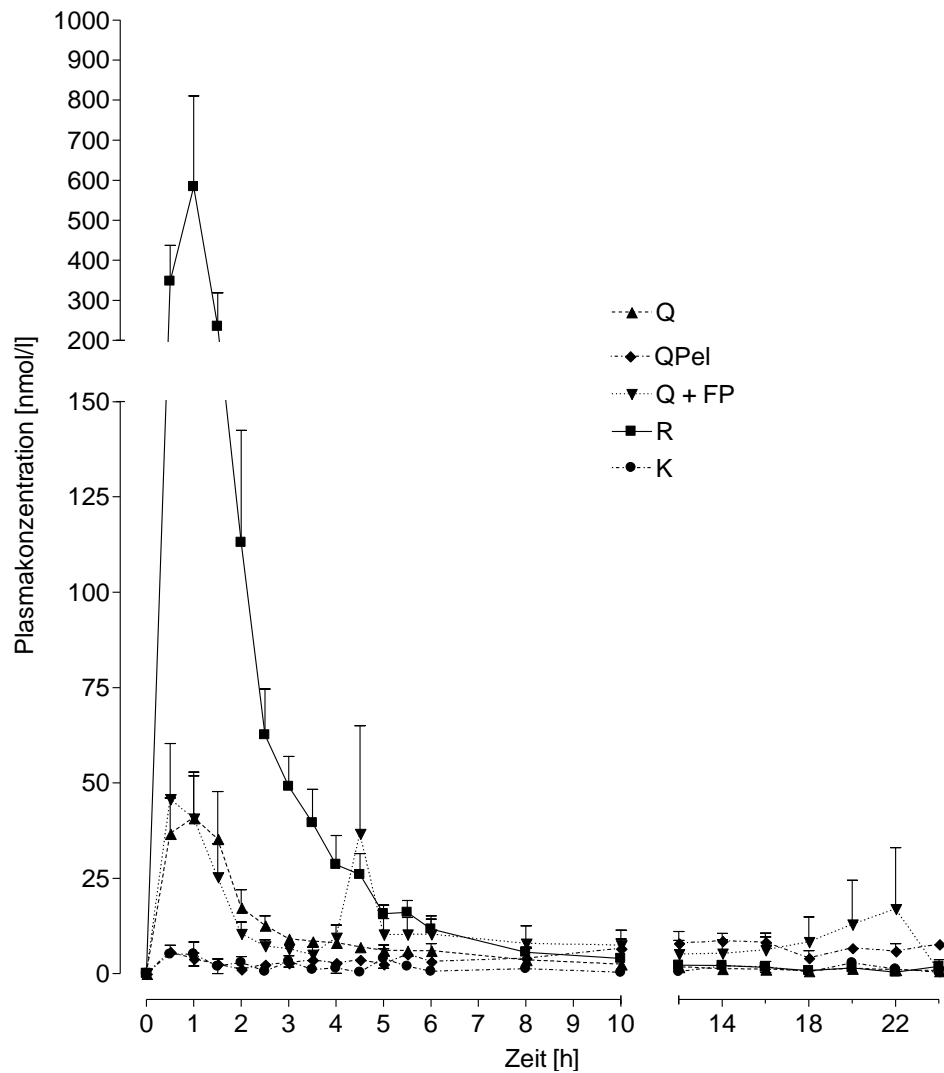


Abb. 17: Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM aus verschiedenen Quercetinquellen. Quercetin-Aglycon (Q), Quercetin-angereicherte Fettpellets (QPel), Q + Quercetin-freies Fettpulver (Q + FP), Rutin (R), Kontrolle (K, ohne Zusatz); Mittelwerte + SEM, n = 5

Tab. 8: Pharmakokinetische Parameter nach intraruminaler Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM als Quercetin-Aglycon (Q), Quercetin-angereicherte Fettpellets (QPel), Q + Quercetin-freies Fettpulver (Q + FP), Rutin (R) sowie ohne Quercetin-Zusatz (K)

	Behandlung				
	K	QPel	Q	R	Q + FP
c_{\max}^1	$9,2 \pm 2,2^a$	$11,1 \pm 2,2^a$	$42,8 \pm 11,2^a$	$590,3 \pm 224,8^b$	$86,4 \pm 17,1^a$
t_{\max}^2	$1,3 \pm 0,5^a$	$15,2 \pm 1,9^b$	$2,1 \pm 1,0^a$	$0,9 \pm 0,1^a$	$5,8 \pm 4,1^a$
AUC_{0-24}^3	$35,2 \pm 10,2^a$	$134,2 \pm 29,6^a$	$129,1 \pm 12,4^a$	$810,8 \pm 212,8^b$	$258,0 \pm 97,0^a$

MW \pm SEM, n = 5; verschiedene Buchstaben in einer Zeile zeigen signifikante Mittelwertunterschiede, $p < 0,05$

¹ c_{\max} [nmol/l], maximale Plasmakonzentration

² t_{\max} [h], Zeit bis zum Erreichen von c_{\max}

³ AUC_{0-24} [nmol/l \times h], Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve (0 bis 24 h) der Gesamtflavonole (Quercetin + Kaempferol + Isorhamnetin + Tamarixetin)

Da bei Verwendung von QPel praktisch kein Anstieg von Quercetin und seinen Metaboliten mit intakter Flavonolstruktur zu beobachten war, wurde in einem weiteren Versuch der Einfluss der Konfektionierung des mit Quercetin angereicherten Futterfettes (pelletiert vs. pulverförmig, QPel vs. QFP) untersucht. Abb. 18 zeigt die Zeitverläufe der Plasmakonzentrationen der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von 20 mg Quercetinäquivalenten/kg KM aus R, QPel bzw. QFP. Die Dosierung musste in diesem Versuch niedriger als im vorigen Versuch gewählt werden, da bei der pulverförmigen Applikation von mit Quercetin angereichertem Futterfett auf Grund des Volumens keine höhere Dosierung möglich war.

Während der Verlauf bei Einsatz von Rutin den früheren (BERGER et al., 2012) bzw. dem zuvor beschriebenen Versuch entsprach, führte der Einsatz von QPel wie zuvor zu keinem nennenswerten Anstieg der Plasmakonzentration der Gesamtflavonole. Die Verabreichung des mit Quercetin angereicherten Fetts in Pulverform (QFP) führte zwar zu einem geringfügigen Anstieg der Gesamtflavonol-Konzentration, allerdings unterschieden sich die aus den Konzentrations-Zeitverläufen ermittelten pharmakokinetischen Parameter zwischen den beiden Fettapplikationen nicht (Tab. 9).

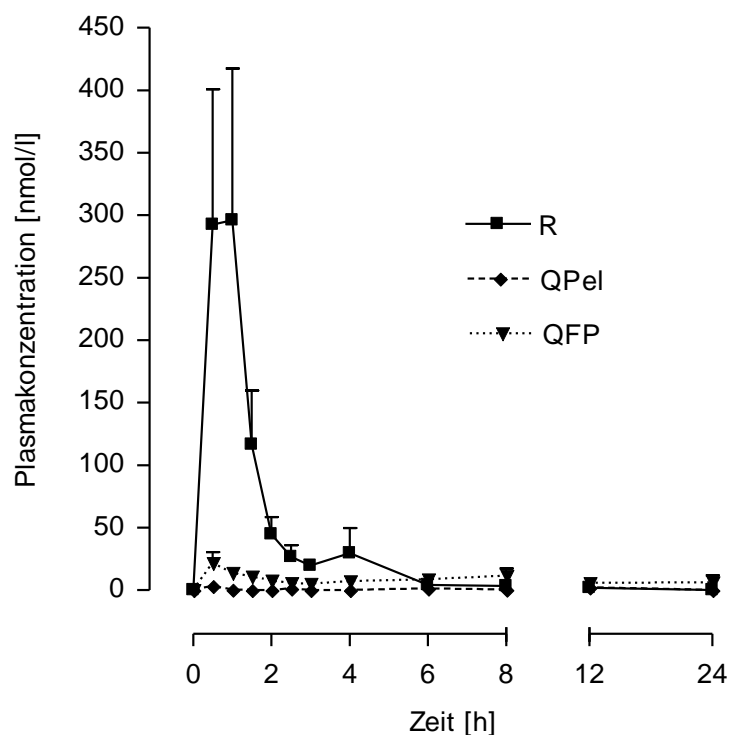


Abb. 18: Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von 20 mg Quercetinäquivalenten/kg KM aus verschiedenen Quercetinquellen. Rutin (R), Quercetin-angereicherte Fettpellets (QPel) und Quercetin-angereichertes Fettpulver (QFP), Mittelwerte + SEM, n = 3

Tab. 9: Pharmakokinetische Parameter nach intraruminaler Applikation von 20 mg Quercetinäquivalenten/kg KM als Rutin (R), Quercetin-angereicherte Fettpellets (QPel) und Quercetin-angereichertes Fettpulver (QFP)

	Behandlung		
	R	QPel	QFP
c_{\max}^1	350,5 ± 97,9 ^a	4,4 ± 1,4 ^b	22,6 ± 8,0 ^b
t_{\max}^2	0,7 ± 0,2 ^a	4,3 ± 3,8 ^a	0,7 ± 0,2 ^a
AUC_{0-24}^3	481,6 ± 170,7 ^a	25,5 ± 17,2 ^b	180,4 ± 75,5 ^{ab}

MW ± SEM, n = 3; verschiedene Buchstaben in einer Zeile zeigen signifikante Mittelwertunterschiede, p < 0,05

¹ c_{\max} [nmol/l], maximale Plasmakonzentration

² t_{\max} [h], Zeit bis zum Erreichen von c_{\max}

³ AUC_{0-24} [nmol/l × h], Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve (0 bis 24 h) der Gesamtflavonole (Quercetin + Kaempferol + Isorhamnetin + Tamarixetin)

4.2.2 Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Zwiebelschalenextrakt und Zwiebelextrakt (V6)

In Abb. 19 sind die Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach i.r. Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM in Form von Quercetin, Rutin, Zwiebelschalenextrakt (ZSE) bzw. Zwiebelextrakt (ZE) dargestellt. Alle in diesem Versuch eingesetzten Quercetinquellen führten zu einem raschen Anstieg der Gesamtflavonolkonzentration im Plasma, gefolgt von einem raschen Konzentrationsabfall (Abb. 19).

Die AUC_{0-24} der Gesamtflavonole nach Applikation von Rutin war signifikant höher als nach der Verabreichung von Quercetin und tendenziell höher als nach ZSE-Applikation ($p = 0,0508$, Tab. 10). Die maximal erreichten Plasmakonzentrationen der Gesamtflavonole (c_{max}) nach der Applikation von ZE waren höher im Vergleich zu allen anderen Applikationsformen. Des Weiteren war c_{max} nach Einsatz von Rutin höher als bei der Verwendung von ZSE bzw. Quercetin (Tab. 10). Die t_{max} -Werte lagen im Mittel zwischen 0,5 (ZSE) und 5,6 h (Q) nach Applikation, wobei sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ergaben.

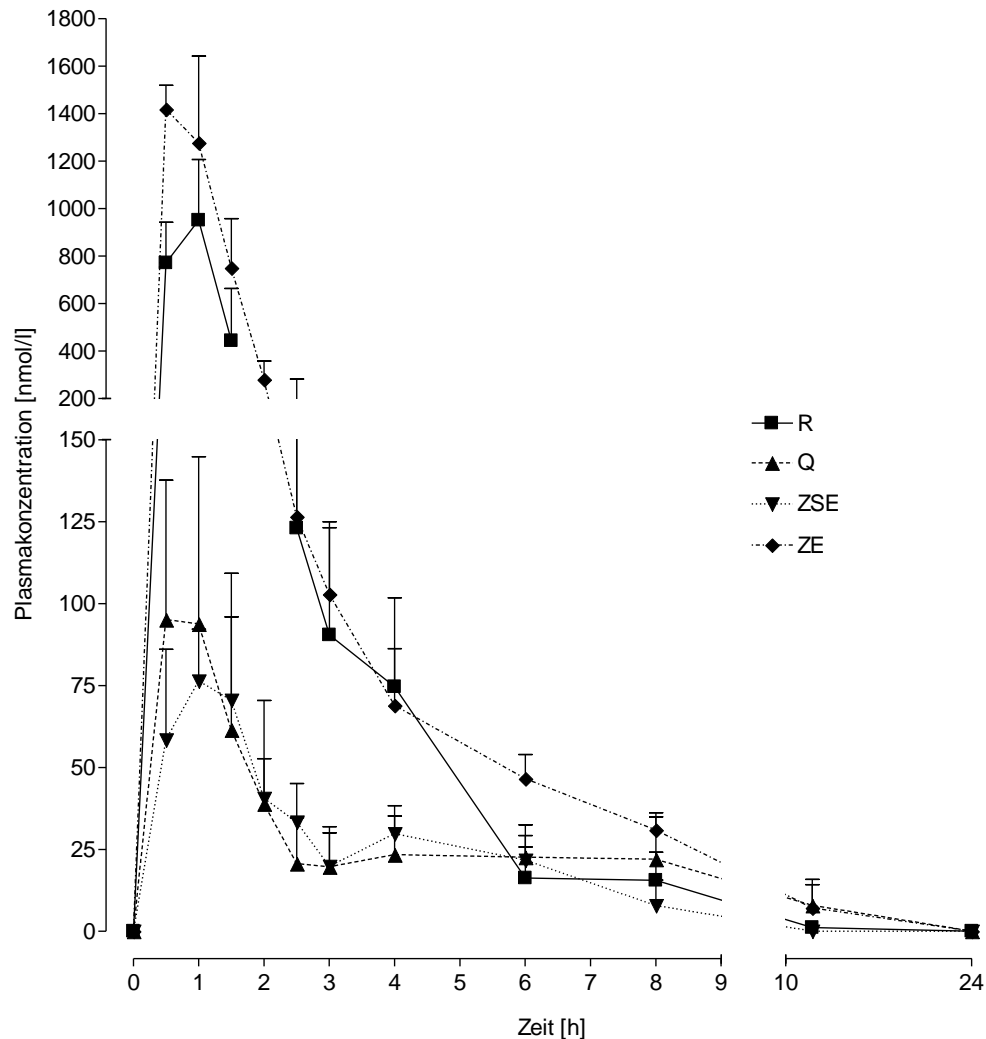


Abb. 19: Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM aus verschiedenen Quercetinquellen. Rutin (R), Quercetin (Q), Zwiebelschalenextrakt (ZSE) und Zwiebelextrakt (ZE), Mittelwerte + SEM, n = 3

Tab. 10: Pharmakokinetische Parameter nach intraruminaler Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM als Rutin (R), Quercetin (Q), Zwiebelschalenextrakt (ZSE) und Zwiebelextrakt (ZE)

	Behandlung			
	R	Q	ZSE	ZE
c_{\max}^1	950,8 ± 255,5 ^a	109,7 ± 42,9 ^b	96,7 ± 10,6 ^b	1647,7 ± 195,9 ^c
t_{\max}^2	1,0 ± 0,0 ^a	3,2 ± 2,4 ^a	0,8 ± 0,3 ^a	0,7 ± 0,2 ^a
AUC_{0-24}^3	1547,5 ± 495,5 ^{a*,c}	379,1 ± 84,8 ^b	265,9 ± 53,8 ^{a*,b}	2349,3 ± 343,5 ^c

MW ± SEM, n = 3; verschiedene Buchstaben in einer Zeile zeigen signifikante Mittelwertunterschiede, $p < 0,05$, * tendenziell verschieden mit $p = 0,0508$

¹ c_{\max} [nmol/l], maximale Plasmakonzentration

² t_{\max} [h], Zeit bis zum Erreichen von c_{\max}

³ AUC_{0-24} [nmol/l × h], Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve (0 bis 24 h) der Gesamtflavonole (Quercetin + Kaempferol + Isorhamnetin + Tamarixetin)

5. Diskussion

Flavonole und Flavanole, Untergruppen der Flavonoide, kommen ubiquitär in pflanzlichen Nahrungs- und Futtermitteln vor. Das Flavonol Quercetin sowie die Flavanole bzw. Flavan-3-ole (Catechine) sind dabei auf Grund ihrer quantitativen Bedeutung, als auch der Vielzahl ihrer positiven gesundheitsfördernden Effekte, welche in zahlreichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien an monogastrischen Spezies nachgewiesen wurden, besonders hervorzuheben. Eine ausreichende systemische Verfügbarkeit voraussetzend, ist der Einsatz dieser beiden Flavonoide bei hochleistenden Milchrindern im Hinblick auf nachgewiesene stoffwechselstabilisierende Wirkungen dieser Verbindungen bei monogastrischen Spezies (Schwein, Ratte, Mensch) gerade zu Beginn der Laktation von grundsätzlichem Interesse. Die Bioverfügbarkeit der Catechine ist, im Gegensatz zum Quercetin, bei Wiederkäuern bisher nicht untersucht. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Bioverfügbarkeit von Catechinen aus einem kommerziellen Grünteeextrakt (GTE) sowie deren ruminaler Abbau und Einfluss auf Fermentationsprozesse *in vitro* untersucht.

Neueste Studien an Rindern haben gezeigt, dass im Gegensatz zu monogastrischen Spezies nicht das Quercetin-Aglycon, sondern das Glucorhamnosid Rutin zu einer wesentlich besseren Bioverfügbarkeit von Quercetin führt, was nach Untersuchungen von BERGER et al. (2012) sowohl auf einem raschen Abbau des Aglycons durch die Mikroorganismen in den Vormägen, als auch auf einer raschen Elimination aus der systemischen Zirkulation beruht. In der vorliegenden Arbeit wurde in Fortführung der genannten Arbeiten die Bioverfügbarkeit des Flavonols aus alternativen Quellen untersucht. Zum einen wurde vor dem Hintergrund des intensiven ruminalen Abbaus ein Quercetin-angereichertes Futterfett in zwei verschiedenen Konfektionierungen (Pellets und Pulver) im Hinblick auf die Bioverfügbarkeit des Quercetins untersucht, da durch die Integration in das Futterfett ein gewisser Schutz vor dem Abbau durch die Mikroorganismen in den Vormägen zu erwarten wäre. Des Weiteren wurden ein Zwiebelschalenextrakt (ZSE) und ein Extrakt aus Zwiebelfleisch (Zwiebelextrakt = ZE) hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von Quercetin untersucht, da beide Extrakte möglicherweise eine natürliche Alternative zum Rutin darstellen.

Bioverfügbarkeit von Catechinen

In der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie zur Bioverfügbarkeit von Catechinen aus einem GTE (V1) wurden keine der im Extrakt originär enthaltenen Catechine (C, EC, ECG, EGC, EGCG und GC) im Plasma detektiert. Das steht im Gegensatz zu Versuchen an duodenal fistulierten Rindern (METGES et al., 2015) und deutet auf einen umfangreichen mikrobiellen Abbau im Pansen hin, worauf im Verlauf der Diskussion noch näher eingegangen wird. Auf Grund der Tatsache, dass die in den Plasmaproben nach i.r. Applikation des GTE detektierten unbekannten Peaks nicht unter Kontrollbedingungen, bei denen keine Catechine appliziert wurden, auftraten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich sehr wahrscheinlich bei diesen unbekannten Peaks um Abbauprodukte der im GTE enthaltenen Catechine handelt und nicht um glucuronidierte, sulfatierte oder methylierte Verbindungen, wie zahlreiche Studien an monogastrischen Spezies gezeigt haben (KUHNLE et al., 2000; DONOVAN et al., 2001; MANACH et al., 2004; STALMACH et al., 2009). Die Arbeitsgruppe TSANG et al. (2005) hat in einer Studie an Ratten die Gewebeverteilung von Flavan-3-olen nach einmaliger oraler Applikation von Catechin-haltigem Traubenkernextrakt untersucht. Neben geringen Flavanolgehalten im Gastrointestinaltrakt (v.a. Duodenum) konnten innerhalb der ersten 4 h nach Applikation hauptsächlich methylierte (-)-Epicatechin- und (+)-Catechin- Metaboliten im Plasma detektiert werden, wogegen nach 6 h weder Metaboliten, noch freies Catechin im Plasma detektiert werden konnten, was für eine rasche Elimination bzw. Verteilung in die Gewebe spricht (TSANG et al., 2005). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe DONOVAN et al. (2001), welche in einem *in situ*- Versuch an Dünndarm-perfundierten Ratten die Absorption und Metabolisierung von (+)-Catechin nach der Applikation fünf verschiedener Dosierungen (1-100 µmol/l) untersucht haben. Dabei kommen die Autoren, auf Grund fehlenden freien (+)-Catechins im Plasma zu dem Schluss, dass dieses umfangreichen Konjugationen in den Enterozyten des Dünndarms unterliegt. Letztendlich haben viele Studien gezeigt, dass nur die nicht-galluierten Catechine (C, EC, EGC, GC) umfangreich konjugiert werden, wohingegen die galluierten Catechine auf Grund geringerer Bindungskapazitäten in nicht-konjugierter Form im Plasma auftauchen (CRESPY et al., 2004; STALMACH et al., 2009; STALMACH et al., 2010; EGERT et al., 2013).

Ruminaler Abbau von Catechinen und Einflüsse auf Fermentationsprozesse

Die Ergebnisse aus den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro*-Versuche zum ruminalen Abbau von Catechinen aus einem GTE (V3) zeigen einen umfangreichen und raschen Abbau der vier im Extrakt enthaltenen dominanten Catechine (EGCG, EGC, EC, GC). In Übereinstimmung dazu berichten auch andere Arbeitsgruppen über einen umfangreichen Abbau von Catechinen durch Faeces- oder Pansen-assoziierte Mikroorganismen (GROENWOUD & HUNDT, 1984; BRAVO et al., 1994; ARUNACHALAM et al., 2003).

Bisherige Untersuchungen lassen darauf schließen, dass Catechine durch Mikroorganismen zu einfachen Phenolsäuren abgebaut werden (GROENWOUD & HUNDT, 1984; FENG, 2006). Inkubationsstudien mit Faeces von Mensch und Ratte haben gezeigt, dass Teecatechine (EC, ECG, EGC, EGCG) durch die intestinale Mikroflora zu Phenylvalerolactonen und dann über weitere Ringspaltung zu niedermolekularen Phenolsäuren (z.B. Gallus- oder Phloroglucinolcarboxylsäure) metabolisiert werden (MESELHY et al., 1997; ARUNACHALAM et al., 2003). Beispiele für Catechin-abbauende Organismen im Pansen sind *Azoarcus anaerobicus* und *Desulfovibrio inopinatus*, welche Zwischenprodukte aus dem Catechinabbau, wie Resorcinol und Hydroxyhydroquinon, als Energiequelle nutzen (PHILIPP & SCHINK, 1998; REICHENBECHER et al., 2000). Im Gegensatz dazu konnte in einer Studie von SCHNEIDER & BLAUT (2000) nachgewiesen werden, dass *Eubacterium ramulus* aus menschlicher Faeces zwar Quercetin-3-Glucosid, aber nicht (+)-Catechin abbaut.

Aus dem fehlenden Einfluss des GTE auf die Gasbildung im HFT bei Verwendung von MLF bzw. Heu als Substrat kann ein Einfluss auf den mikrobiellen Abbau der organischen Substanz in den Vormägen durch das Extrakt ausgeschlossen werden. Das steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von OSKOEIAN et al. (2013) und BRAVO et al. (1994), die ebenfalls keinen signifikanten Einfluss von Catechin auf die *in vitro*- Gasbildung nach 24 h Inkubationszeit bei Verwendung von Pansensaft bzw. Faeces (Ratte) als Inokulum feststellen konnten. Daraus kann man schließen, dass keine negativen Effekte von Catechinen auf die Zusammensetzung der Mikrobe population oder –aktivität (wie z.B. Hemmung des Abbaus von ADF und NDF) in den hier verwendeten Konzentrationen (20 bzw. 40 mg GTE/l Inkubationsmedium) zu erwarten sind.

Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Quellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Quellen untersucht, wobei zunächst die Ergebnisse im Hinblick auf allgemeine Aussagen und im Anschluss daran auf applikationsbezogene Aussagen diskutiert werden.

Sämtliche Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zur Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Quercetinquellen zeigen analog den Untersuchungen von BERGER et al. (2012), dass die im Plasma auftauchenden Konzentrationen an Gesamtflavonolen (Quercetin + Kaempferol + Isorhamnetin + Tamarixetin) nach den Rutin-Applikationen wesentlich höher waren, als nach Applikation des Aglycons (6 – 10-fach). Dieses Ergebnis steht im klaren Gegensatz zu Untersuchungen an monogastrischen Spezies, welche eine deutlich geringere Bioverfügbarkeit von Quercetin nach der Rutin-Applikation als nach der Applikation des Aglycons gezeigt haben (MANACH et al., 1997; MORAND et al., 2000; CERMAK et al., 2003). Untersuchungen mit duodenal appliziertem Quercetin und Rutin bei laktierenden Kühen haben ähnliche Ergebnisse, wie bei den Versuchen an monogastrischen Spezies hervorgebracht, wodurch deutlich wird, dass die Unterschiede nach i.r. Applikation auf mikrobielle Vorgänge in den Vormägen zurück zu führen und nicht speziesspezifischer Natur sind (GOHLKE et al., 2013). Die bessere systemische Verfügbarkeit von Quercetin nach Applikation des Aglycons im Vergleich zu Rutin nach oraler Applikation bei monogastrischen Spezies ist darauf zurück zu führen, dass Rutin erst im Colon mikrobiell deglykosyliert und anschließend partiell absorbiert wird, wohingegen die Absorption des Aglycons bereits im Dünndarm geschieht (s. 2.3). Im Dünndarm findet im Vergleich zum Dickdarm aufgrund der geringeren Bakterienzahl ein geringerer luminaler Abbau des Quercetin-Aglycons statt, was letztendlich die höhere Bioverfügbarkeit bewirkt (ERLUND et al., 2000; CERMAK et al., 2003). Dagegen findet nach i.r. Applikation beim Rind die mikrobielle Spaltung des Zuckerrests in den Vormägen statt. Die wesentlich höheren Plasmakonzentrationen von Quercetin und seinen Metaboliten nach der Applikation von Rutin im Vergleich zur Aglycon-Applikation beim Rind unterstützen die Annahmen von BERGER et al. (2012) dass der Zuckerrest am Rutin das darin befindliche Quercetin vor mikrobiellem Abbau „schützt“. Allerdings bleibt dabei fraglich, wie dieser Schutz genau aussieht. Diesbezüglich scheint vielmehr eine bessere Verteilung im Pansenlumen des im Vergleich zum Aglycon besser wasserlöslichen Rutins denkbar. Damit wäre zum einen möglich, dass das bakteriell aus Rutin freigesetzte Quercetin in stärkerem Ausmaß mit der Pansenwand in Kontakt käme um dann dort

absorbiert zu werden. Dabei muss man bedenken, dass das freigesetzte Quercetin ebenfalls dem raschen Abbau durch die Mikroorganismen unterliegt, wodurch die absolute absorbierbare Menge gesenkt und/oder zumindest nur innerhalb eines kleinen Zeitfensters (innerhalb 1 h nach Applikation) absorbiert würde. In diesem Zusammenhang wäre ebenfalls der rasche Weitertransport des in der flüssigen Phase gelösten Quercetins aus dem Rutin in den Dünndarm denkbar, da die flüssige Ingesta mehr oder weniger kontinuierlich vom Pansen bis zum Dünndarm gelangt (KASKE, 2015). Das hieße, dass innerhalb einer halben Stunde nach Applikation durchaus für die Absorption ausreichende Mengen an Aglycon am Dünndarm ankämen. Das schlechter wasserlösliche Quercetin-Aglycon dagegen haftet möglicherweise an den Festbestandteilen der Pansenmatte, woraufhin es einerseits in geringerem Ausmaß als das Rutin mit der Pansenwand in Berührung käme (würde daher weniger absorbiert werden) und andererseits in geringerem Umfang über die Flüssigphase in den Dünndarm transportiert würde. Hier sei erwähnt, dass der Flux von intaktem Rutin bis zum Colon nahezu ausgeschlossen werden kann, da in der vorliegenden Arbeit nach 8 h nach i.r. Applikation von Rutin keine nennenswerten Gehalte an Quercetin bzw. Quercetin-Derivaten messbar waren.

Auch wenn diese genannten physikalischen Faktoren vermutlich eine maßgebliche Rolle bei der Absorption von Quercetin und seinen Metaboliten spielen, können allerdings im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine abschließenden Aussagen über mögliche Absorptionsmechanismen sowie Verteilung der Flavonole im Panseninhalt getroffen werden.

Das applikationsunabhängige frühe Auftreten des Peakmaximums (c_{\max}) der Gesamtflavonolgehalte innerhalb 1 h deckt sich mit den Angaben von BERGER et al. (2012) und steht im klaren Gegensatz zu Untersuchungen an monogastrischen Spezies, wo bei Schwein und Mensch maximale Plasmakonzentrationen der Flavonole nach Applikation des Aglycons nach 2 – 4 h detektiert wurden (ADER et al., 2000; CERMAK et al., 2003; EGERT et al., 2008). Nach der Applikation von Rutin lagen maximale Plasmakonzentrationen sogar erst nach 4 – 8 h vor (ERLUND et al., 2000; CERMAK et al., 2003). In der vorliegenden Studie an Rindern wurde ebenfalls ein rascher Applikations-unabhängiger Abfall der Plasmakonzentrationen der Gesamtflavonole nach bereits einer Stunde beobachtet. Da wie bereits eingangs erwähnt die Absorption des Rutins bei monogastrischen Spezies erst nach enzymatischer Spaltung durch bakterielle β -Glucosidasen im Dickdarm erfolgt (BOKKENHEUSER et al., 1987; KIM et al., 1998; WALLE et al., 2000; HEIN et al., 2008), scheint es logisch, dass die maximalen Plasmakonzentrationen so viel später erfolgen, als es nach i.r. Applikation beim Rind der Fall ist, wo es nach Aussagen von BERGER et al. (2012) bereits im Pansen

durch bakterielle Enzyme abgebaut wird. Der rasche Anstieg sowie das Erreichen maximaler Plasmakonzentrationen innerhalb 1 h nach Applikation sprechen für eine schnelle Absorption aus dem Pansen, wohingegen der rasche Abfall der Konzentrationen für eine schnelle Gewebeverteilung sowie Eliminierung der Flavonole beim Wiederkäuer spricht. Das steht in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen der Studie von LUNDH et al. (1990), welche ebenfalls innerhalb 1 h nach oraler Applikation isoflavonhaltiger Silage an Rinder maximale Konzentrationen der Isoflavone Formononetin, Daidzein und Equol im Plasma gefunden haben und eine Absorption aus dem Pansen für möglich halten. In Anlehnung an diese Hypothese ist die Studie von CRESPIY et al. (2002) an Mäusen mit legiertem Magen-ausgang interessant, da an diesen Tieren gezeigt werden konnte, dass Quercetin-Aglycon unter diesen Bedingungen durchaus bereits aus dem Magen absorbiert wird. Mäuse besitzen eine ausgeprägte pars proventrikularis mit verhorntem Plattenepithel. Damit bestehen morphologische Parallelitäten zur Pansenwand des Wiederkäuers, welche ebenfalls durch ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel (*Epithelium mucosae*) gekennzeichnet ist (VOLLMERHAUS & SCHNORR, 1967) und für eine Absorption von Quercetin aus dem Pansen spricht. Über mögliche Absorptionsmechanismen von Flavonoiden in der Pansenwand ist allerdings bisher nichts bekannt.

Am kurzzeitigen Anstieg bzw. dem raschen Abfall der Gesamtflavonol-Konzentrationen im Plasma könnte auch eine rasche und umfangreiche Metabolisierung durch die Mikroorganismen im Pansen beteiligt sein. Eine solche rasche Metabolisierung konnte von BERGER et al. (2015) in *in vitro*- Untersuchungen gezeigt werden. CHENG et al. (1969) isolierten aus bovinem Pansensaft drei verschiedene Bakterienstämme, die in der Lage sind, glycosidische Quercetin-Verbindungen zu spalten. Dabei spalten *Butyrivibrio fibrisolvens* D1 und *Selenomonas ruminantium* GA192 lediglich die glycosidische Bindung im Rutin und nutzen die Rutinose als Energiequelle, das freigewordene Aglycon wurde jedoch nicht weiter abgebaut. In einer weiterführenden Studie konnte der anaerobe Abbau von Rutin zu Phloroglucinol, CO₂, 3,4-Dihydroxybenzoesäure sowie 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure durch *Butyrivibrio* sp. C3 nachgewiesen werden (KRISHNAMURTY et al., 1970). Dabei vermuten die Autoren, dass zunächst der Zuckerrest durch intrazelluläre Glycosidasen freigesetzt und anschließend der heterozyklische Ring des Aglycons hydrolytisch gespalten wird. Aus einer späteren Arbeit von KRUMHOLZ & BRYANT (1986) geht hervor, dass das ebenfalls aus bovinem Pansen stammende *Eubacterium oxidoreducens* in der Lage ist, Quercetin als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen, um es zu 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure, Acetat, Butyrat und CO₂ zu fermentieren. In einer weiteren Studie von TSAI et al.

(1976) konnte gezeigt werden, dass das im Pansen vorkommende Bakterium *Coprococcus* sp. Pe15 in der Lage ist, Quercetin, jedoch nicht Rutin abzubauen.

Eine weitere Erklärung für den raschen Abfall der Gesamtflavonol-Konzentrationen im Plasma nach i.r. Applikation könnte die Elimination über die Resekretion im Speichel sein. Dazu wurde in einem weiteren *in vivo*- Versuch Quercetin in Form von mit Quercetin angereicherten Fettpellets (4 % Quercetin) sowie Rutin in einer Dosierung von 50 mg Quercetin-äquivalente/kg KM i.r. appliziert und anschließend alle halbe Stunde (bis 3 h nach Applikation) Speichel gesammelt, welcher auf Flavonolgehalte analysiert wurde (Daten nicht gezeigt). Da in den Speichelproben zu keinem Zeitpunkt Quercetin nachgewiesen werden konnte, kann man davon ausgehen, dass der rasche Abfall der Plasmakonzentration der Gesamtflavonole nicht auf eine umfangreiche Elimination aus dem Plasma via Speichel zurückzuführen ist.

Quercetin stellt in der vorliegenden Arbeit unabhängig von der Applikationsform (V4-V6) den Hauptmetaboliten der im Plasma nachweisbaren Verbindungen mit intakter Flavonolstruktur dar (Quercetin: 75 – 89 %; Kaempferol: 6 – 14 %; Isorhamnetin: 4 – 11 %). Die Plasmakonzentrationen von Tamarixetin lagen in fast allen Plasmaproben unter der Nachweisgrenze und können somit vernachlässigt werden. Untersuchungen von ADER et al. (2000) und REINBOTH et al. (2010) konnte nach der Applikation von Quercetin-Aglycon bei Schweinen bzw. Hunden ebenfalls Quercetin als Hauptmetaboliten im Plasma feststellen. Im Gegensatz dazu stellt bei der Ratte das Isorhamnetin mit 80 % den Hauptmetaboliten im Plasma dar. Tamarixetin kommt dagegen kaum vor (MORAND et al., 1998). Eine neuere Studie von WEIN & WOLFFRAM (2013) zur oralen Bioverfügbarkeit von Quercetin beim Pferd ergab analog den eigenen Ergebnissen, dass nach oraler Applikation von Quercetin (20 mg Quercetinäquivalente/kg KM), dieses mit 88 % der Gesamtflavonole den Hauptmetaboliten darstellt. Isorhamnetin und Kaempferol kamen beim Pferd nur in geringen Anteilen vor (9 bzw. 3 %) und Tamarixetin wurde nicht detektiert (WEIN & WOLFFRAM, 2013). Da in der vorliegenden Arbeit sämtliche Plasmaproben vor der Analyse mit β -Glucuronidase/Sulfatase enzymatisch behandelt wurden, ist keine Aussage über den Gehalt an freiem Quercetin und seinen nicht konjugierten Derivaten Kaempferol, Isorhamnetin und Tamarixetin im Plasma möglich. Man kann aber davon ausgehen, dass die Ergebnisse aus den ebenfalls am Rind durchgeführten Untersuchungen von BERGER et al. (2012) und LUNDH et al. (1990) übertragbar sind und demnach mehr als 80 % des Quercetins und seiner oben genannten Metaboliten in konjugierter Form im Plasma vorliegen. Das steht ebenfalls in Übereinstimmung mit vielen bisherigen Studien an monogastrischen Spezies

(ADER et al., 2000; GRAEFE et al., 2001; CERMAK et al., 2003; REINBOTH et al., 2010). In einer Studie am Pferd dagegen wurde festgestellt, dass 75 % des Gesamtflavonolgehaltes im Plasma in freier Form vorlagen (WEIN & WOLFFRAM, 2013). Es ist anzumerken, dass die konjugierten Formen der Flavonole auf Grund „blockierter“ reaktiver Hydroxylgruppen weit weniger antioxidativ wirken, als die freien Verbindungen. *In vitro*- Studien zeigen, dass diese Wirkung teilweise um 50 % im Vergleich zum Aglycon reduziert ist (DAY et al., 2000b; MANACH et al., 1998; JANISCH et al., 2004; DUEÑAS et al., 2011).

Im Folgenden werden die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bioverfügbarkeitsstudien im Hinblick auf applikationsspezifische Effekte (Fett, Zwiebelextrakte) auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin beim Rind diskutiert.

Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Konfektionierungen mit Fett

Auf Grund ihrer Stabilität gegenüber mikrobiellem Abbau werden Ca-Seifen von langkettigen Fettsäuren zur Ummantelung von Proteinen eingesetzt, wodurch eine Erhöhung des am Dünndarm absorbierbaren Proteins erreicht werden soll (HOLTER et al., 1993; SKLAN & TINSKY, 1993). Aus demselben Grund wurde in den vorliegenden Studien zur Bioverfügbarkeit aus alternativen Quercetinquellen, freies Quercetin in ein Futterfett eingeschmolzen. Dabei soll die Ummantelung des Quercetins als solches zum Schutz desselben vor dem Abbau durch die Mikroorganismen in den Vormägen führen.

Die Ergebnisse der *in vivo*-Versuche zur Bioverfügbarkeit von Quercetin aus den beiden Konfektionierungen mit Fett (Pellets, Pulver, jeweils 4 % Quercetin) haben gezeigt, dass das eingesetzte Futterfett nicht zu einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Quercetin führt. Auch wenn die Konditionierung als Pulver zu leicht höheren Plasma-Konzentrationen der Gesamtflavonole im Vergleich zu den Pellets führte, ist die systemische Verfügbarkeit aus dem Glucorhamnosid Rutin in V4 und V5 6- bzw. 19-fach höher als aus den Pellets, sowie 3-fach höher als aus der Fettpulver-Konditionierung (V5). Damit stellen die verwendeten Konfektionierungen mit Fett (4 % Quercetin) keine Alternative zum Rutin dar. Die Verteilung des Fettes im Pansen, die Passage via Labmagen in den Dünndarm sowie die Absorption des eingesetzten Fettes im Dünndarm könnte eine Rolle bei der geringen systemischen Verfügbarkeit von Quercetin nach Applikation der Konfektionierungen mit Fett gespielt haben. Sowohl die Pellets, als auch das Pulver waren nach 24 h noch im Pansen, die Pellets sogar nach 48 h noch im Kot sichtbar. Das weist auf eine langsame Passage des Fettes durch den Verdauungstrakt sowie eine geringe oder zumindest unvollständige Solubilisierung und Absorption des applizierten Fettes hin und spiegelt sich in den signifikant höheren t_{\max} -

Werten von $15,2 \pm 1,9$ h nach der Applikation von Quercetin als Fettpellets im Vergleich zu allen anderen Applikationen wieder. Die Absorption von Fetten und fettähnlichen Substanzen erfolgt sowohl bei monogastrischer Spezies als auch beim Wiederkäuer im Dünndarm. Dabei spielt die Solubilisierung von Spaltprodukten aus der Hydrolyse von Triacylglycerinen, Phospholipiden und anderen fettlöslichen Verbindungen (z.B. Flavonole, Vitamin A, Carotinoide) eine entscheidende Rolle (PALMQUIST & JENKINS, 1980; CAREY et al., 1983). Die Tatsache, dass wie bereits erwähnt intakte Fettpellets in den Faeces nachweisbar waren zeigt, dass dieser Prozess unter den Bedingungen unvollständig stattgefunden hat. Das späte Auftreten der maximalen Plasmakonzentrationen der Gesamtflavonole weist dagegen auf eine langsame Passage aus den Vormägen hin, die auch durch die Tatsache belegt werden kann, dass auch nach 48 h noch zahlreiche Fettpellets im Pansen zu finden waren. Im Gegensatz zu den eigenen Versuchen haben die Untersuchungen von AZUMA et al. (2002) und LESSER et al. (2004) durch den Zusatz von Emulgatoren bzw. absorbierbaren Fetten (Triglyceride, Schweineschmalz) eine Verbesserung der Absorption von Quercetin unter Beteiligung des lymphatischen Weges und damit eine gesteigerte Bioverfügbarkeit von Quercetin bei monogastrischen Spezies (Ratte und Schwein) gezeigt.

Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Zwiebeln

Zwiebeln zählen zu den Quercetin-reichsten Gemüsen in Nordeuropa (HERTOG et al., 1995), wobei im Zwiebelfleisch hauptsächlich Quercetin-4'-O- β -Monoglucoside und Quercetin-3,4'-O- β -Diglucoside enthalten sind (HERRMANN, 1988). Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Extrakte aus der Zwiebel hinsichtlich ihrer Glucosid-Zusammensetzung nicht genau definiert werden konnten, werden sie hier entgegen vielen Literaturangaben als Glycoside bezeichnet. Durch seinen hohen Gehalt an Quercetin-Glycosiden (20 %, Tab. 6) könnte das ZE eine weitere potentielle Quercetinquelle zum Rutin (Quercetin-3-O-Glucorhamnosid) beim Rind darstellen. Da, wie bereits mehrfach erwähnt, der Zuckerrest am Rutin das Quercetin vor mikrobiellem Abbau zu schützen scheint (BERGER et al., 2012), liegt die Vermutung nahe, dass es ebenfalls zu einem „Schutz“ des Quercetins durch die Glycoside im ZE kommt.

Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem ZE numerisch höher als aus Rutin, aber statistisch nicht signifikant verschieden war. Das ist möglicherweise auf die geringe Tierzahl in Kombination mit den hohen tierindividuellen Streuungen zurück zu führen. Die Applikation von ZSE führte dagegen zu ähnlichen Bioverfügbarkeiten, wie aus dem Aglycon, war somit deutlich niedriger, als aus dem ZE bzw. Rutin. Von der Tatsache ausgehend, dass in dem verwendeten ZE lediglich 50 % des darin enthaltenen Quercetins in Form von Glykosiden vorlagen (Rest überwiegend Aglycon) kann spekuliert werden, dass eine äquimolare Applikation von Quercetin über die in den Zwiebeln enthaltenen Glykoside bzw. über Rutin zu einer deutlich höheren Bioverfügbarkeit von Quercetin aus den Quercetin-Glykosiden der Zwiebel im Vergleich zu Rutin führen dürfte. HOLLMAN et al. (1995) haben in einer Studie mit Ileostomiepatienten ebenfalls deutlich höhere Bioverfügbarkeiten von Quercetin aus Quercetin-Glycosiden in Zwiebeln als aus dem Rutin feststellen können (52 vs. 17 %). Im Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse aus einer *in vivo*- Studie an Menschen von WICKOWSKI et al. (2003). In dieser Studie konnte nach oraler Aufnahme von Quercetin aus Schalotten eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem Aglycon, als aus den Glucosiden festgestellt werden.

Ursachen für die bessere Bioverfügbarkeit aus dem in der vorliegenden Studie verwendeten ZE können auf einer besseren Verteilung auf Grund höherer Löslichkeit der Quercetin-Mono- und Diglycoside im Gegensatz zu Rutin liegen (s.o.) und/oder auf sogenannten Matrixeffekten beruhen. Es gibt wenige Arbeiten zum Einfluss von Lebens- und Futtermittelzusammensetzungen auf die Absorption von Quercetin. Neben den schon erwähnten

Arbeiten von AZUMA et al. (2002) und LESSER et al. (2004) in denen die Absorption von Quercetin durch Zulage von Emulgatoren bzw. Fett gezeigt werden konnte, haben auch andere Arbeitsgruppen durch den Einsatz von sogenannten Lösungsvermittlern (Propylenglycol bzw. Hydroxylpropyl- β -Cyclodextrin) die Absorption von Quercetin verbessern können (PISKULA & TERAU, 1998; SRI et al., 2007). Untersuchungen von EGERT et al. (2012) zeigten dazu eine deutlich erhöhte Bioverfügbarkeit von auf Müsliriegeln aufgebrachtem ZSE im Gegensatz zu in Kapseln appliziertem Quercetin-Aglycon. Die Autoren erklären den Haupteffekt mit der Veränderung der Matrix durch das Einbringen in einen Zuckerkomplex auf dem Müsliriegel, wodurch ebenfalls die Löslichkeit des lipophilen Quercetin-Aglycons erhöht und damit die Verteilung im Verdauungstrakt verbessert wird. Da aber in dieser Studie zwei verschiedene Substanzen (Aglycon bzw. ZSE) in wiederum zwei unterschiedlichen Applikationsformen (Kapsel bzw. Müsliriegel) zum Einsatz kamen, sind die Ursachen im Hinblick auf die Steigerung der Bioverfügbarkeit des Quercetins nicht eindeutig zuzuordnen. Sie können zum einen auf der Substanz und zum anderen auf der Applikationsform beruhen.

Grundsätzlich ist, unabhängig von der Spezies, die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus den Monoglucosiden der Zwiebel besser als aus dem Aglycon (HOLLMAN & KATAN, 1997; GRAEFE et al., 2001; MANACH & DONOVAN, 2004). Daher kann man zusammenfassend festhalten, dass die Ergebnisse aus den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Zwiebelextrakten sowie unterschiedlichen Zubereitungsformen der Zwiebel (z.B. roh, gebraten, geschnitten) überwiegend auf Matrixeffekten beruhen, da oftmals unterschiedliche Applikationsformen miteinander verglichen wurden (WICZKOWSKI et al., 2008; EGERT et al., 2012). Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Extrakte mit gleicher Textur eingesetzt, weshalb Matrixeffekte als Ursache für eine bessere Absorption mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden können. Die bessere Bioverfügbarkeit von Quercetin aus dem ZE im Vergleich zum ZSE ist allein in den im ZE enthaltenen Mono- und Diglycosiden begründet, da das ZSE hauptsächlich Aglycon enthält. Dabei können die Glycoside einerseits als Lösungsvermittler im Pansen fungieren und/oder andererseits, wie schon beim Rutin vermutet, zu einem gewissen „Schutz“ des darin enthaltenen Aglycons vor mikrobiellem Abbau in den Vormägen führen, wodurch letztendlich die bessere Bioverfügbarkeit erklärt werden kann.

In der Literatur sind einige Erkenntnisse über den mikrobiellen Abbau von Quercetin-Derivaten in Abhängigkeit vom Zuckerrest beschrieben. AURA et al. (2002) beispielsweise

haben anhand des Umsatzes entsprechender Quercetin-Derivate in menschlicher Faeces die Aktivität verschiedener Enzyme bestimmt, wobei sich zeigte, dass die α -Rhamnosidase eine geringere Aktivität als die β -Glucosidase und β -Glucuronidase aufwies, was zu verzögerter Freisetzung des Aglycons aus Rutin im Vergleich zum Isoquercitrin führte. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch CERMAK et al. (2006) und HEIN et al. (2008), die den mikrobiellen Abbau von Quercetin-Derivaten im Schweinedarm untersucht haben. Die Studie der Arbeitsgruppe HEIN et al. (2008) zum Abbau verschiedener Flavonolglycoside über einen Zeitraum von 24 h am Schweinecaecum-Modell haben ergeben, dass sowohl das eingesetzte Glycosid (Mono-, Di- und Triglycosid) als auch das Hydroxylierungsmuster des gebundenen Zuckerrests für den Umfang des Abbaus entscheidend ist. Die Deglycosilierung aller Quercetin-Glycoside erfolgte innerhalb der ersten 4 h, wobei sich die Abbaugeschwindigkeit in Abhängigkeit des Zuckerrests zwischen den einzelnen Quercetin-Metaboliten deutlich unterschied: Isoquercitrin (1 h) > Quercetin-3-Galactosid (1,5 h) > Quercitrin und Rutin (4 h) (WINTER et al., 1989; WINTER et al., 1991; JUSTESEN et al., 2000; BRAUNE et al., 2001; AURA et al., 2002; SCHOEFER et al., 2002; SCHOEFER et al., 2003; LABIB et al., 2004; HEIN et al., 2008). Anhand dieser Erkenntnisse könnte für die eigenen Untersuchungen ebenfalls ein Einfluss der unterschiedlichen Zuckerreste (ZE vs. Rutin) auf Umfang und Abbaugeschwindigkeit geschlussfolgert werden. Da in der vorliegenden Studie aber kein Unterschied zwischen den Zeitpunkten des Erreichens der maximalen Plasmakonzentrationen (t_{\max}) nach der Applikation von Rutin bzw. ZE zu verzeichnen war, kann zumindest ein Einfluss des Zuckerrests auf die Abbaugeschwindigkeit ausgeschlossen werden. Die in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen von Mikroben ausgehenden Enzymaktivitäten (AURA et al., 2002; CERMAK et al., 2006; HEIN et al., 2008) könnten allerdings im Hinblick auf den Umfang der mikrobiellen Abbauprozesse von Quercetin-Derivaten in Abhängigkeit des Zuckerrests eine Erklärung für die höhere Bioverfügbarkeit von Quercetin aus ZE im Vergleich zum Rutin sein.

Abschließend kann zu den Erkenntnissen aus den Bioverfügbarkeitsversuchen mit ZE und ZSE aus der vorliegenden Arbeit festgehalten werden, dass das ZE eine Alternative zu dem bisher eingesetzten Rutin darstellt. Dennoch müssen für den Einsatz dieses Extrakts in der Praxis noch weitere Fragen geklärt werden. Zum einen ist die Bereitschaft der Tiere zur oralen Aufnahme über das Futter unbekannt und bleibt in weiteren Fütterungsversuchen zu

prüfen. Des Weiteren ist der Kostenfaktor für den praktischen Einsatz in einem Milchviehhaltenden Unternehmen von großer Relevanz. Für den im Rahmen des in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchs wurde ein ZE eingesetzt, welches in Quercetin-äquivalenter Dosierung 50 % mehr Kosten verursachte, als das eingesetzte Rutin. Es bleibt zu prüfen, inwieweit Kosten und Aufwandmenge des ZE angepasst werden können und somit besonders vor dem Hintergrund möglicher positiver gesundheitsfördernder Effekte und damit einhergehender Einsparungen veterinärmedizinischer Kosten, für den Einsatz unter praktischen Bedingungen geeignet ist.

6. Zusammenfassung

Die Bioverfügbarkeit von Catechinen und Quercetin wurde auf Grund ihrer nachgewiesenen gesundheitsfördernden Wirkungen zwar bei monogastrischen Spezies umfangreich untersucht, allerdings liegen für den Wiederkäuer nur wenige Daten vor. Da man bei ausreichender systemischer Verfügbarkeit der Flavonoide beim Rind von ähnlichen Wirkungen wie bei monogastrischen Spezies ausgehen kann, ist der Einsatz von Quercetin und Catechinen auch bei der Milchkuh auf Grund der besonderen metabolischen Stoffwechselsituation zu Beginn der Laktation von grundsätzlichem Interesse.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Bestimmung der Verfügbarkeit von Catechinen aus einem Grünteeextrakt (GTE, 10 bzw. 50 mg /kg KM) nach intraruminaler (i.r.) Applikation an pansenfistulierte, nicht laktierende Kühe (n = 5). Da sich einerseits die bakteriziden bzw. bakteriostatischen Effekte von Catechinen negativ auf die Fermentationsprozesse im Pansen auswirken können, andererseits die Catechine aber auch mikrobiellen Abbauprozessen im Pansen unterliegen, wurde des Weiteren *in vitro* der Einfluss des GTE (20 bzw. 40 mg GTE/l Inkubationsmedium) auf die Fermentation der organischen Substanz anhand der Gasbildung (Hohenheimer Futterwerttest) sowie der mikrobielle Abbau der Catechine untersucht. Nach der i.r. Applikation des GTE waren keine der im GTE enthaltenen Catechine im Plasma detektierbar, was auf einen umfangreichen mikrobiellen Abbau in den Vormägen schließen lässt. Die Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau der Catechine in den Vormägen bestätigen diese Schlussfolgerung. Aus dem fehlenden Einfluss des GTE auf die Gasbildung bei Verwendung von Milchleistungsfutter bzw. Heu als Substrat kann des Weiteren zumindest bei den eingesetzten Konzentrationen von Catechinen ein Einfluss derselben auf den mikrobiellen Abbau der organischen Substanz in den Vormägen ausgeschlossen werden.

Vorausgegangene Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit des Flavonols Quercetin beim Rind haben gezeigt, dass im Gegensatz zu monogastrischen Spezies Quercetin nach Applikation des Quercetin-Glukorhamnosids Rutin wesentlich besser systemisch verfügbar ist als nach Verabreichung des Quercetin-Aglycons. Da in früheren Untersuchungen ein umfangreicher ruminaler Abbau des Quercetin-Aglycons gezeigt werden konnte, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit fetthaltige Applikationsformen von Quercetin (Quercetin-haltige(s) Fettpellets bzw. Fettpulver, Quercetiningehalt 4 %) in einer Dosierung von 50 mg Quercetinäquivalente/kg KM hinsichtlich der Bioverfügbarkeit des Flavonols untersucht. Die dabei gemessene Bioverfügbarkeit von Quercetin unterschied sich jedoch nicht von der bei Applikation des Quercetin-Aglycons.

Als weitere potentielle natürliche Quellen von Quercetin wurden ferner ein kommerzielles Zwiebschalen- und ein Zwiebelextrakt (je 50 mg Quercetinäquivalente/kg KM) hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von Quercetin untersucht. Der Einsatz des Aglycon-reichen Zwiebschalenextrakts führte dabei zu einer ähnlichen Bioverfügbarkeit von Quercetin wie die Applikation des Aglycons, wohingegen das Quercetin-Mono- und Diglycosid-reiche Zwiebelextrakt eine ähnliche Bioverfügbarkeit von Quercetin wie Rutin aufwies. Allerdings ist in Anbetracht der Tatsache, dass lediglich 50 % des im eingesetzten Zwiebelextrakts enthaltenen Quercetin in Form von Glycosiden vorliegt (Rest überwiegend Aglycon), ist bei äquimolarer Gabe der im Zwiebelextrakt enthaltenen Glykoside wahrscheinlich eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit von Quercetin im Vergleich zur Anwendung von Rutin zu erwarten.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Catechine beim Rind nach oraler bzw. i.r. Applikation nicht bioverfügbar sind, da sie in den Vormägen einem umfangreichen mikrobiellen Abbau unterliegen. In den hier verwendeten Konzentrationen sind allerdings keine negativen Effekte auf ruminale Fermentationsprozesse durch die Catechine zu erwarten. Die Ergebnisse aus den Bioverfügbarkeitsversuchen mit verschiedenen Quercetinquellen zeigen des Weiteren klar, dass unter den hier untersuchten Quercetinquellen neben Rutin nur das Zwiebelextrakt hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von Quercetin interessant erscheint.

7. Summary

Due to their proven health-promoting effects the bioavailabilities of catechins and quercetin have been intensively investigated in monogastric species, whereas for ruminants only few data exists. Provided that these substances are sufficiently bioavailable in ruminants similar effects of flavonoids in cattle as in monogastric species can be assumed. Thereby, the application of quercetin and catechins in dairy cows is of principal interest, because of the specific metabolic situation at the beginning of lactation.

One aim of the present study was therefore to determine the bioavailability of catechins from a green tea extract (GTE, 10 or 50 mg/kg body weight, BW) after intraruminal (i.r.) application to rumen fistulated, none lactating cows (n = 5). Due to the fact that on the one hand the antimicrobial effects of catechins can affect fermentation processes within the rumen and on the other hand catechins might be degraded by rumen microorganisms, the influence of the GTE (20 or 40 mg GTE/l incubation medium) on the fermentation of organic matter as well as the microbial degradation of catechins were investigated *in vitro* (Hohenheim Gas Test). After i.r. application of GTE, none of the catechins present in the GTE were detectable in plasma, suggesting an extensive microbial degradation in the fore-stomachs. This conclusion is substantiated by the finding that catechins were extensively and rapidly degraded by rumen microorganisms *in vitro*. Because no influence of catechins on the *in vitro* degradation of organic matter using concentrate feed or grass hay as substrates was observed, it can be further concluded that at least at concentration used, a negative influence on microbial degradation of organic matter in the fore-stomachs can be excluded.

Previous studies on the bioavailability of the flavonol quercetin in cattle have shown that, in contrast to monogastric species, quercetin after application of the quercetin glucorhamnosid rutin is much better systemically available than after administration of the Quercetin aglycone. Because of substantial ruminal degradation of quercetin aglycone shown in earlier studies, the bioavailability of quercetin of different quercetin containing fat applications (as fat pellets or fat powders enriched with 4 % quercetin) was investigated at a dosage of 50 mg quercetin equivalents/kg BW. The bioavailability of quercetin, however, did not differ compared to the application of quercetin aglycone.

As additional potential natural sources of quercetin, a commercial onion scale extract and an onion bulb extract (each at a dose of 50 mg quercetin equivalents/kg BW) with regard to the bioavailability of quercetin were examined. Application of the aglycone-rich onion skin extract resulted in a similar bioavailability of quercetin as the application of the aglycone,

whereas the onion bulb extract rich in quercetin mono- and diglucosides showed a similar bioavailability of quercetin as rutin. However, taking into account that in fact only 50 % of the quercetin in the used onion bulb extract is present as glycosides (rest predominantly as aglycone), it can be speculated that the application of equimolar amounts of the glycosides contained in the onion bulb extract may lead to a higher bioavailability of quercetin as compared to the application of rutin.

In summary the results of the present study demonstrate, that catechins are not bioavailable in cattle after oral or i.r. application, due to an extensive microbial degradation in the fore-stomachs. At least at concentrations used in this study no negative effects on ruminal fermentation processes of the catechins can be assumed. Furthermore, results from the bioavailability studies with various sources of quercetin show that among the examined sources of quercetin beside rutin only the onion bulb extract appears to be an interesting source regarding the bioavailability of quercetin in ruminants.

8. Literatur

- ADER P, BLÖCK M, PIETZSCH S, WOLFFRAM S (2001) Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). *Cancer Letters* **162** (2), 175–180.
- ADER P, WESSMANN A, WOLFFRAM S (2000) Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radical Biology & Medicine* **28** (7), 1056–1067.
- AGULLO G, GAMET-PAYRASTRE L, MANENTI S, VIALA C, RÉMÉSY C, CHAP H, PAYRASTRE B (1997) Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochemical Pharmacology* **53** (11), 1649–1657.
- AHERNE S, O'BRIEN NM (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **18** (1), 75–81.
- AKTORIES K, FÖRSTERMANN U, HOFMANN F, STARKE K (2013) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 11. Auflage, Urban & Fisher, Elsevier GmbH. München. ISBN: 978-3-437-42523-3
- ARON PM, KENNEDY JA (2008) Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research* **52** (1), 79–104.
- ARTS ICW, SESINK ALA, FAASSEN-PETERS M, HOLLMAN PCH (2004) The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *British Journal of Nutrition* **91** (6), 841–847.
- ARUNACHALAM M, MOHAN RAJ M, MOHAN N, MAHADEVAN A (2003) Biodegradation of Catechin. *Proceedings of the Indian National Science Academy* **B69** (4), 353–370.
- AURA A, O'LEARY KA, WILLIAMSON G, OJALA M, BAILEY M, PUUPPONEN-PIMIÄ R, NUUTILA AM, OKSMAN-CALDENTY K, POUTANEN K (2002) Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** (6), 1725–1730.
- AZUMA K, IPPOUSHI K, ITO H, HIGASHIO H, TERAOKA J (2002) Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** (6), 1706–1712.
- BAI H, ZHU BT (2008) Strong activation of cyclooxygenase I and II catalytic activity by dietary bioflavonoids. *The Journal of Lipid Research* **49** (12), 2557–2570.
- BAI H, ZHU BT (2010) Myricetin and quercetin are naturally occurring co-substrates of cyclooxygenases *in vivo*. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **82** (1), 45–50.
- BEECHER GR (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **133**, 3248S–3254S.
- BELL AW (1995) Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science* **73**, 2804–2819.
- BERGER L, WEIN S, BLANK R, METGES C, WOLFFRAM S (2012) Bioavailability of the flavonol quercetin in cows after intraruminal application of quercetin aglycone and rutin. *Journal of Dairy Science* **95** (9), 5047–5055.

- BERGER LM, BLANK R, WEIN S, ZORN F, METGES CC, WOLFFRAM S (2015) Ruminal degradation of quercetin and its influence on ruminal fermentation in cows. *Journal of Dairy Science*. (in press)
- BERNARD F, SABLE S, CAMERON B, PROVOST J, DESNOTTES J, CROUZET J, BLANCHE F (1997) Glycosylated flavones as selective Iihibitors of topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41** (5), 992–998.
- BESLE J, VIALA D, MARTIN B, PRADEL P, MEUNIER B, BERDAGUÉ J, FRAISSE D, LAMAISON J, COULON J (2010) Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *Journal of Dairy Science* **93** (7), 2846–2856.
- BHAGWAT S, HAYTOWITZ DB, HOLDEN JM (2014) USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, 3. Auflage, 176 S., Beltsville, Maryland (<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>)
- BIEGER J, CERMAK R, BLANK R, DE BOER, VINCENT C.J., HOLLMAN PCH, KAMPHUES J, WOLFFRAM S (2008) Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *The Journal of Nutrition* **138**, 1417–1420.
- BLAUT M, SCHOEFER L, BRAUNE A (2003) Transformation of flavonoids by intestinal micro-organisms. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **2** (73), 79–87.
- BLOCK SS, BUTLER WR, EHRHARDT RA, BELL AW, VAN AMBURGH, M. E., BOISCLAIR YR, (2001) Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *Journal of Endocrinology* **171** (339-348).
- BOKKENHEUSER VD, SHAKLETON CH, WINTER J (1987) Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *bacteroides* from humans. *Biochemical Journal* **248**, 953–956.
- BOSE M, LAMBERT JD, JU J, REUHL KR, SHAPSES SA, YANG CS (2008) The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *The Journal of Nutrition* **138**, 1677–1683.
- BOUTIN JA, MEUNIER F, LAMBERT P, HENNIG P, BERTIN D, SERKIZ B, VOLLAND J (1993) *In vivo* and *in vitro* glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats. *Drug Metabolism and Disposition* **21**, 1157–1166.
- BRANDWEIN BJ (1965) The pigments in three cultivars of the common onion (*Allium cepa*). *Journal of Food Science* (30), 680–685.
- BRAUNE A, GÜTSCHOW M, ENGST W, BLAUT M (2001) Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (12), 5558–5567.
- BRAVO L, ABIA R, EASTWOOD MA, SAURA-CALIXTO F (1994) Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. *British Journal of Nutrition* **71**, 933–946.
- BROUDISCOU L, PAPON Y, BROUDISCOU AF (2000) Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology* **87**, 263–277.
- CAI Y, MASUDA N, FUJITA Y, KAWAMOTO H, ANDO S (2001) Development of a new method for preparation and conservation of tea grounds silage. *Animal Science Journal* **72**, 536–541.

- CAREY MC, SMALL DM, BLISS C.M. (1983) Lipid digestion and absorption. *Annual Review of Nutrition* **45**, 651–677.
- CERMAK R, BREVES G, LÜPKE M, WOLFFRAM S (2006) In vitro degradation of the flavonol quercetin and of quercetin glycosides in the porcine hindgut. *Archives of Animal Nutrition* **60** (2), 180–189.
- CERMAK R, LANDGRAF S, WOLFFRAM S (2003) The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *Journal of Nutrition* **133**, 2802–2807.
- CHEN X, YIN OQP, ZUO Z, CHOW MSS (2005) Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharmaceutical Research* **22** (6), 892–901.
- CHENG K, JONES GA, SIMPSON FJ, BRYANT MP (1969) Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic rutin degradation. *Canadian Journal of Microbiology* **15**, 1365–1371.
- CLIFFORD MN (2000) Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1063–1072.
- COWAN MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12** (4), 564–582.
- CRESPY V, MORAND C, BESSON C, COTELLE N, VÉCIN H, DEMIGNÉ C, RÉMÉSY C (2003) The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **284**, 980–988.
- CRESPY V, MORAND C, BESSON C, MANACH C, DEMIGNÉ C, RÉMÉSY C (2002) Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 618–621.
- CRESPY V, MORAND C, MANACH C, BESSON C (1999) Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **277**, 120–126.
- CRESPY V, NANCOZ N, OLIVEIRA M, HAU J, COURTET-COMPONDU M, WILLIAMSON G (2004) Glucuronidation of the green tea catechins, (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epicatechin-3-gallate, by rat hepatic and intestinal microsomes. *Free Radical Research* **38** (9), 1025–1031.
- CROZIER A, LEAN MEJ, McDONALD MS, BLACK C (1997) Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 590–595.
- CUSHNIE TT, LAMB AJ (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26** (5), 343–356.
- DAI J, MUMPER RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules (Basel, Switzerland)* **15** (10), 7313–7352.
- DAY AJ, BAO Y, MORGAN MR, WILLIAMSON G (2000b) Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology and Medicine* **29** (12), 1234–1243.

- DAY AJ, CAÑADA F, DÍAZ JC, KROON PA, MCLAUCHLAN R, FAULDS CB, PLUMB GW, MORGAN MR, WILLIAMSON G (2000a) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters* **468** (2-3), 166–170.
- DAY AJ, DUPONT M, RIDLEY S, RHODES M, RHODES MJ, MORGAN MR, WILLIAMSON G (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Letters* **436** (1), 71–75.
- DAY AJ, GEE JM, DUPONT M, JOHNSON IT, WILLIAMSON G (2003) Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology* **65** (7), 1199–1206.
- DAY AJ, MELLON F, BARRON D, SARRAZIN G, MORGAN MR, WILLIAMSON G (2001) Human metabolism of dietary flavonoids: Identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radical Research* **35**, 941–952.
- DE BOER, VJC, DIHAL AA, VAN DER WOUDE H, ARTS ICW, WOLFFRAM S, ALINK GM, RIETJENS IMCM, KEIJER J, HOLLMAN PCH (2005) Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *The Journal of Nutrition* **135**, 1718–1725.
- DEL RIO D, RODRIGUEZ-MATEOS A, SPENCER JP, TOGNOLINI M, BORGES G, CROZIER A (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* **18** (14), 1818–1892.
- DIXON RA, DEY PM, LAMB CJ (1983) Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (55), 1–69.
- DONOVAN JL, CRESPIY V, MANACH C, MORAND C, BESSON C, SCALBERT A, RÉMÉSY C (2001) Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *Journal of Nutrition* **131**, 1753–1757.
- DUEÑAS M, SURCO-LAOS F, GONZÁLEZ-MANZANO S, GONZÁLEZ-PARAMÁS AM, SANTOS-BUELGA C (2011) Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *European Food Research and Technology* **232** (1), 103–111.
- EGERT S, TERESZCZUK J, WEIN S, MÜLLER MJ, FRANK J, RIMBACH G, WOLFFRAM S (2013) Simultaneous ingestion of dietary proteins reduces the bioavailability of galloylated catechins from green tea in humans. *European Journal of Nutrition* **52** (1), 281–288.
- EGERT S, WOLFFRAM S, BOSY-WESTPHAL A, BOESCH-SAADATMANDI C, WAGNER AE, FRANK J, RIMBACH G, MUELLER MJ (2008) Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *The Journal of Nutrition* **138**, 1615–1621.
- EGERT S, WOLFFRAM S, SCHULZE B, LANGGUTH P, HUBBERMANN EM, SCHWARZ K, ADOLPHI B, BOSY-WESTPHAL A, RIMBACH G, MÜLLER MJ (2012) Enriched cereal bars are more effective in increasing plasma quercetin compared with quercetin from powder-filled hard capsules. *British Journal of Nutrition* **107**, 539–546.
- ERLUND I, KOSONEN T, ALFTHAN G, MÄENPÄÄ J, PERTTUNEN K, KENRAALI J, PARANTAINEN J, ARO A (2000) Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology* **56**, 545–553.
- ERLUND I (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* **24** (10), 851–874.

- FENG WY (2006) Metabolism of green tea catechins. *Current Drug Metabolism* **7**, 755–809.
- FOSSEN T, PEDERSEN AT, ANDERSEN ØM, 1998) Flavonoids from red onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry* **47** (2), 281–285.
- FRAISSE D, CARNAT A, VIALA D, PRADEL P, BESLE J, COULON J, FELGINES C, LAMAISON J (2007) Polyphenolic composition of a permanent pasture: variations related to the period of harvesting. *Science of Food and Agriculture* **13** (87), 2427–2435.
- GAMET-PAYRASTRE L, MANENTI S, GRATACAP M, TULLIEZ J, CHAP H, PAYRASTRE B (1999) Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *General Pharmacology* **32** (3), 279–286.
- GASPARIN FRS, SALGUEIRO-PAGADIGORRIA CL, BRACHT L, ISHII-IWAMOTO EL, BRACHT A, CONSTANTIN J (2003a) Action of quercetin on glycogen catabolism in the rat liver. *Xenobiotica* **33** (6), 587–602.
- GASPARIN FRS, SPITZNER FL, ISHII-IWAMOTO EL, BRACHT A, CONSTANTIN J (2003b) Actions of quercetin on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver. *Xenobiotica* **33** (9), 903–911.
- GEE JM, DUPONT M, RHODES MJ, JOHNSON IT (1998) Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biology and Medicine* **25** (1), 19–25.
- GEE JM, DUPONT MS, DAY AJ, PLUMB GW, WILLIAMSON G, JOHNSON IT (2000) Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *Free Radical Biology and Medicine* **25**, 19–25.
- GNONI GV, PAGLIALONGA G, SICULELLA L (2009) Quercetin inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat-liver cells. *European Journal of Clinical Investigation* **39** (9), 761–768.
- GOHLKE A, INGELMANN CJ, NÜRNBERG G, STARKE A, WOLFFRAM S, METGES CC (2013) Bioavailability of quercetin from its aglycone and its glucorhamnoside rutin in lactating dairy cows after intraduodenal administration. *Journal of Dairy Science* **96** (4), 2303–2313.
- GRAEFE EU, WITTIG J, MUELLER S, RIETHLING AK, UEHLEKE B, DREWELOW B, PFORTE H, JACOBASCH G, DERENDORF H, VEIT M (2001) Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *Journal of clinical pharmacology* **41** (5), 492–499.
- GRAF BA, AMEHO C, DOLNIKOWSKI GG, MILBURY PE, CHEN C, BLUMBERG JB (2006) Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *The Journal of Nutrition* **136**, 39–44.
- GRAHAM HN (1992) Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine* **21** (3), 334–350.
- GROENWOUDE G, HUNDT H (1984) The microbial metabolism of (+)-catechin to two novel diarylpropan-2-ol metabolites *in vitro*. *Xenobiotica* **14** (9), 711–717.
- HARBORNE JB (1999) Recent advances in chemical ecology. *Natural Product Reports* **16**, 509–523.
- HARBORNE JB, WILLIAMS CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481–504.
- HEIN E, ROSE K, VAN'T SLOT G, FRIEDRICH AW, HUMPF H (2008) Deconjugation and degradation of flavonol glycosides by pig cecal microbiota characterized by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56** (6), 2281–2290.
- HERRMANN K (1988) On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und- Forschung* **168**, 1–5.

- HERTOG M, HOLLMAN PCH, KATAN MB (1992b) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Journal of agricultural and food chemistry* **40** (12), 2379–2383.
- HERTOG MG, HOLLMAN PC, VAN DE PUTTE, BETTY (1993) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of agricultural and food chemistry* **41** (8), 1242–1246.
- HERTOG MG, HOLLMAN PC, VENEMA DP (1992a) Optimization of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. *Journal of agricultural and food chemistry* **40** (9), 1591–1598.
- HERTOG MG, KROMHOUT D, ARAVANIS C, BLACKBURN H, BUZINA R, FIDANZA F, GIAMPAOLI S, JANSEN A, MENOTTI A, NEDELJKOVIC S, PEKKARINEN M, SIMIC BS, TOSHIMA H, FESKENS E. J. M., HOLLMAN PCH, KATAN MB (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine* **155**, 381–386.
- HOLLMAN PC, BIJSMAN MN, VAN GAMEREN Y, CNOSSEN EP, VRIES JH DE, KATAN MB (1999) The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research* **31** (6), 569–573.
- HOLLMAN PC, KATAN MB (1997) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **51** (8), 305–310.
- HOLLMAN PCH, VRIES JHM DE, VAN LEEUWEN SD, MENGELERS MJB, KATAN MB (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition* **62**, 1276–1282.
- HOLTER JB, HAYES HH, KIERSTEAD N, WHITEHOUSE J (1993) Protein-fat bypass supplement for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **76**, 1342–1352.
- IKIGAI H, NAKAE T, HARA Y, SHIMAMURA T (1993) Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1147** (1), 132–136.
- INGVARTSEN K (2006) Feeding- and management-related diseases in the transition cow. *Animal Feed Science and Technology* **126**, 175–213.
- JANISCH KM, WILLIAMSON G, NEEDS P, PLUMB GW (2004) Properties of Quercetin conjugates: modulation of LDL oxidation and binding to human serum albumin. *Free Radical Research* **38** (8), 877–884.
- JUSTESEN U, ARRIGONI E, LARSEN BR, AMADO R (2000) Degradation of flavonoid glycosides and aglycones during *in vitro* fermentation with human faecal flora. *LWT – Food Science and Technology* **33** (6), 424–430.
- KAO YH, HIIPAKKA RA, LIAO S (2000) Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology* **141** (3), 980–987.
- KASKE M (2015) Motorik des Magen-Darm-Kanals. In: VON ENGELHARD W, BREVES G (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere. Physiologische Grenzen der Hochleistungskuh*, 4. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart, 15 S., 347–379. ISBN: 978-3-8304-1259-5

- KEHRLI ME, NEILL JD, BURVENICH C, GOFF JP, LIPPOLIS JD, REINHARD TA, NONNEKE BJ (2006) Energy and protein effects on the immune system. In: SEJRSEN K, HVELPLUND T, NIELSEN MO (Hrsg.): Ruminant Physiology. Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress, Wageningen Academic Publishers. Wageningen, Niederlande, 455–471. ISBN: 987-90-76998-64-7
- KHAN N, MUKHTAR H (2007) Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences* **81** (7), 519–533.
- KIM D, JUNG E, SOHNG I, HAN J, KIM T, HAN MJ (1998) Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Archives of Pharmacal Research* **21** (1), 17–23.
- KIM J, KANG M, CHOI H, JEONG S, LEE Y, KIM J (2011) Quercetin attenuates fasting and post-prandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. *Nutrition Research and Practice* **5** (2), 107.
- KO W, SHIH C, LAI Y, CHEN J, HUANG H (2004) Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure–activity relationships. *Biochemical Pharmacology* **68** (10), 2087–2094.
- KOEPPEN BH, VAN DER SPUY JE (1961) Microbial hydrolysis of quercetin glycosides from the inner scales of the onion. *South African Journal of Agricultural Science* **4**, 557–563.
- KONDO M, KITA K, YOKOTA H (2004a) Feeding value to goats of whole-crop oat ensiled with green tea waste. *Animal Feed Science and Technology* **113**, 71–81.
- KONDO M, NAKANO M, KANEKO A, AGATA H, KITA K, YOKOTA H (2004b) Ensiled Green Tea Waste as Partial Replacement for Soybean Meal and Alfalfa Hay in Lactating Cows. *Asian-Australian Journal of Animal Science* **17** (7), 960–966.
- KRISHNAMURTY HG, CHENG K, JONES GA, SIMPSON FJ, WATKIN JE (1970) Identification of products produced by the anaerobic degradation of rutin and related flavonoids by *Butyrivibrio* sp. C3. *Canadian Journal of Microbiology* **16**, 759–767.
- KRUMHOLZ LR, BRYANT M (1986) *Eubacterium oxidoreducens* sp. nov. requiring H₂ or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin. *Archives of Microbiology* **144**, 8–14.
- KÜHNAU J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics* **24**, 117–191.
- KUHNLE G, SPENCER JP, SCHROETER H, SHENOY B, DEBNAM ES, SRAI SS, RICE-EVANS C, HAHN U (2000) Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **277** (2), 507–512.
- LABIB S, ERB A, KRAUS M, WICKERT T, RICHLING E (2004) The pig caecum model: A suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids. *Molecular Nutrition & Food Research* **48** (4), 326–332.
- LAMBERT N (1999) Purification of cytosolic β -glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1435** (1-2), 110–116.
- LEE MJ, PRABHU S, MENG X, LI C, YANG CS (2000) An improved method for the determination of green and black tea polyphenols in biomatrices by high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. *Analytical biochemistry* **279** (2), 164–169.

- LEIBER F, KUNZ C, KREUZER M (2012) Influence of different morphological parts of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and its major secondary metabolite rutin on rumen fermentation *in vitro*. Czech Journal of Animal Science **57** (1), 10–18.
- LESSER S, CERMAK R, WOLFFRAM S (2004) Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. The Journal of Nutrition **134**, 1508–1511.
- LESSER S, WOLFFRAM S (2006) Oral bioavailability of the flavonol quercetin - A Review. Current Topics in Nutraceutical Research **4** (3/4), 239–256.
- LIANG Y, HUANG Y, TSAI S, LIN-SHIAU S, CHEN C, LIN J (1999) Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. Carcinogenesis **20** (10), 1945–1952.
- LOURENÇO M, CARDOZO PW, CALSAMIGLIA S, FIEVEZ V (2008) Effects of saponins, quercetin, eugenol, and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters. Journal of Animal Science **86** (11), 3045–3053.
- LUNDH T, PETTERSON HI, MARTINSSON K (1990) Comparative levels of free and conjugated plant estrogens in blood plasma of sheep and cattle fed estrogenic silage. Journal of agricultural and food chemistry **38**, 1530–1534.
- MACDONALD IA, BUSSARD RG, HUTCHISON DM, HOLDEMAN LV (1984) Rutin-induced r-glucosidase activity in *Streptococcus faecium* VGH-1 and *Streptococcus sp.* strain FRP-17 isolated from human feces: formation of the mutagen, quercetin, from rutin. Applied and Environmental Microbiology **47** (2), 350–355.
- MANACH C, DONOVAN JL (2004) Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. Free Radical Research **38** (8), 771–785.
- MANACH C, MORAND C, CRESPIY V, DEMIGNÉ C, TEXIER O, RÉGÉRAT F, RÉMÉSY C (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. FEBS Letters **426** (3), 331–336.
- MANACH C, MORAND C, DEMIGNÉ C, TEXIER O, RÉGÉRAT F, RÉMÉSY C (1997) Bioavailability of rutin and quercetin in rats. FEBS Letters **409** (1), 12–16.
- MANACH C, MORAND C, TEXIER O, FAVIER M, AGULLO G, DEMIGNÉ C, RÉGÉRAT F, RÉMÉSY C (1995) Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. Journal of Nutrition **125**, 1911–1922.
- MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, RÉMÉSY C, JIMÉNEZ LILIANA (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition (79), 727–747.
- MANACH C, WILLIAMSON G, MORAND C, SCALBERT A, RÉMÉSY C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. The American Journal of Clinical Nutrition **81**, 230S–242S.
- MANZANO S, WILLIAMSON (2010) Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. Molecular Nutrition & Food Research **54** (12), 1773–1780.
- MARTENS H, BREVES G (2015) Physiologische Grenzen der Hochleistungskuh. In: VON ENGELHARD W, BREVES G (Hrsg.): Physiologie der Haustiere. Physiologische Grenzen der Hochleistungskuh, 4. Auflage, Enke Verlag. Stuttgart, 15 S., 648–652. ISBN: 978-3-8304-1259-5

- MCDONALD MS, HUGHES M, BURNS J, LEAN MEJ, MATTHEWS D, CROZIER A (1998) Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *Journal of agricultural and food chemistry* **46**, 368–375.
- MENKE KH, STEINGAß H (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* **28**.
- MESELHY MR, NAKAMURA N, HATTORI M (1997) Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **45** (5), 888–893.
- METGES CC, GOHLKE A, WOLFFRAM S (2015) Bioavailability of a single dose of catechins administered intraduodenally in high-yielding German Holstein cows. *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology* **24**, 85.
- MIDDLETON E, KANDASWAMI C, THEOHARIDES TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* **52**, 673–751.
- MIDDLETON JR. E, KANDASWAMI C (1992) Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochemical Pharmacology* **43** (6), 1167–1179.
- MORAND C, CRESPIY V, MANACH C, BESSON C, DEMIGNÉ C, RÉMÉSY C (1998) Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **275**, 212–219.
- MORAND C, MANACH C, CRESPIY V, RÉMÉSY C (2000) Quercetin 3-O- β -glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radical Research* **33**, 667–676.
- MORI A, NISHINO C, ENOKI N, TAWATA S (1987) Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* **26** (8), 2231–2234.
- MULLEN W, EDWARDS CA, CROZIER A (2006) Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *British Journal of Nutrition* **96**, 107–116.
- NAKAHARA K, KAWABATA S, ONO H, OGURA K, TANAKA T, OOSHIMA T, HAMADA S (1993) Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of *mutans streptococci*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 968–973.
- NAUMANN C, BASSLER R (Hrsg.) (1997) METHODENBUCH Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. ausgewählte chem. Analysen, 3. Auflage. Darmstadt, VDLUFA-Verlag, 26 S. ISBN: 3-922712-66-7
- NISHIDA T, ERUDEN B, HOSODA K, MATSUYAMA H, NAKAGAWA K, MIYAZAWA T, SHIOYA S (2006) Effects of green tea (*Camellia sinensis*) waste silage and polyethylene glycol on ruminal fermentation and blood components in cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* **19** (12), 1728–1736.
- OHMENG KA, SCHWENDER CF, FU KP, BARRETT JF (1993) DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **3** (2), 225–230.
- O'LEARY KA, DAY AJ, NEEDS PW, MELLON FA, O'BRIEN NM, WILLIAMSON G (2003) Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an *in vitro* hepatic model: the role of human β -

- glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochemical Pharmacology* **65** (3), 479–491.
- OSKOEIAN E, ABDULLAH N, OSKOEIAN A (2013) Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. *BioMed Research International* **2013**, 349129.
- PALMQUIST DL, JENKINS TC (1980) Fat in lactation rations: review. *Journal of dairy science* **63** (1), 1–14.
- PERKIN AG, HUMMEL JJ (1896) LXXVII. - Occurrence of quercetin in the outer skins of the bulb of the onion (*Allium cepa*). *Journal of the Chemical Society* **69**, 1295–1298.
- PETRI N, TANNERGREN C, HOLST B, MELLON FA, BAO Y, PLUMB GW, BACON J, O'LEARY KA, KROON PA, KNUTSON L, FORSELL P, ERIKSSON T, LENNERNAS H, WILLIAMSON G (2003) Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum *in vivo*. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* **31** (6), 805–813.
- PHILIPP B, SCHINK B (1998) Evidence of two oxidative reaction steps initiating anaerobic degradation of resorcinol (1,3-dihydroxybenzene) by the denitrifying bacterium *Azoarcus anaerobius*. *Journal of Bacteriology* **180** (14), 3644–3649.
- PISKULA MK, TERAOKA J (1998) Quercetin's Solubility Affects Its Accumulation in Rat Plasma after Oral Administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** (10), 4313–4317.
- PLAPER A, GOLOB M, HAFNER I, OBLAK M, ŠOLMAJER T, JERALA R (2003) Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **306** (2), 530–536.
- RASHEED A, HAIDER M (1998) Antibacterial activity of *Camellia sinensis* extracts against dental caries. *Archives of Pharmacol Research* **21** (3), 348–352.
- RECHNER AR, SMITH MA, KUHNLE G, GIBSON GR, DEBNAM ES, SRAI SS, MOORE KP, RICE-EVANS CA (2004) Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine* **36** (2), 212–225.
- REICHENBECHER W, PHILIPP B, SUTER MJ, SCHINK B (2000) Hydroxyhydroquinone reductase, the initial enzyme involved in the degradation of hydroxyhydroquinone (1,2,4-trihydroxybenzene) by *Desulfovibrio inopinatus*. *Archives of Microbiology* **173** (3), 206–212.
- REINBOTH M, WOLFFRAM S, ABRAHAM G, UNGEMACH FR, CERMAK R (2010) Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. *British Journal of Nutrition* **104**, 198–203.
- RIVERA L, MORÓN R, SÁNCHEZ M, ZARZUELO A, GALISTEO M (2008) Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity* **16** (9), 2081–2087.
- SAKANAKA S, KIM M, TANIGUCHI M, YAMAMOTO T (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry* **53** (9), 2307–2311.
- SAKANAKA S, SHIMURA N, AIZAWA M, KIM M, YAMAMOTO T (1992) Preventive effect of green tea polyphenols against dental caries in conventional rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **56** (4), 592–594.

- SCALBERT A, MANACH C, MORAND C, RÉMÉSY C, JIMÉNEZ L (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical reviews in food science and nutrition **45** (4), 287–306.
- SCHNEIDER H, BLAUT M (2000) Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. Archives of Microbiology **173**, 71–75.
- SCHNEIDER H, SCHWIERTZ A, COLLINS MD, BLAUT M (1999) Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. Archives of Microbiology **171**, 81–91.
- SCHOEFER L, MOHAN R, BRAUNE A, BIRINGER M, BLAUT (2002) Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*. FEMS Microbiology Letters **208**, 197–202.
- SCHOEFER L, MOHAN R, SCHWIERTZ A, BRAUNE A, BLAUT M (2003) Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. Applied and Environmental Microbiology **69** (10), 5849–5854.
- SKLAN D, TINSKY M (1993) Production and reproduction responses by dairy cows fed varying undegradable protein coated with rumen bypass fat. Journal of Dairy Science **76**, 216–223.
- SLIMESTAD R, FOSSEN T, VÅGEN IM (2007) Onions: a source of unique dietary flavonoids. Journal of agricultural and food chemistry **55**, 10067–10080.
- SMITH GJ, THOMSEN SJ, MARKHAM KR, ANDARY C, CARDON D (2000) The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **136**, 87–91.
- SRI KV, KONDAIAH A, RATNA JV, ANNAPURNA A (2007) Preparation and characterization of quercetin and rutin cyclodextrin inclusion complexes. Drug Development and Industrial Pharmacy **33** (3), 245–253.
- STALMACH A, MULLEN W, STEILEN H, WILLIAMSEN G, LEAN ME, CROZIER A (2010) Absorption, metabolism, and excretion of green tea flavan-3-ols in humans with an ileostomy. Molecular Nutrition & Food Research **54** (3), 323–334.
- STALMACH A, TROUFFLARD S, SERAFINI M, CROZIER A (2009) Absorption, metabolism and excretion of Cholaadi green tea flavan-3-ols by humans. Molecular Nutrition & Food Research **53**, 44–53.
- TSAI CG, GATES DM, INGLEDEW WM, JONES GA (1976) Products of anaerobic phloroglucinol degradation by *Coprococcus* sp. Pe15. Canadian Journal of Microbiology **22**, 159–164.
- TSANG C, AUGER C, MULLEN W, BORNET A, ROUANET J, CROZIER A, TEISSEDRE P (2005) The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. British Journal of Nutrition **94**, 170–181.
- ULBRICH K, REICHARDT N, BRAUNE A, KROH LW, BLAUT M, ROHN S (2015) The microbial degradation of onion flavonol glucosides and their roasting products by the human gut bacteria *Eubacterium ramulus* and *Flavonifractor plautii*. Food Research International **67**, 349–355.
- VAN DE WETERING K, BURKON A, FEDDEMA W, BOT A, JONGE H DE, SOMOZA V, BORST P (2009) Intestinal breast cancer resistance protein (BCRP)/Bcrp1 and multidrug resistance protein 3 (MRP3)/Mrp3 are involved in the pharmacokinetics of resveratrol. Molecular pharmacology **75** (4), 876–885.

- VAN KNEGSEL A, VAN DEN BRAND H, DIJKSTRA J, KEMP B (2007) Effects of dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation. *Theriogenology* **68**, S274.
- VERNON RG (2005) Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *Journal of Dairy Research* **72** (4), 460.
- VIJAYA K, ANANTHAN S, NALINI R (1995) Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp. — a cell culture study. *Journal of Ethnopharmacology* **49** (2), 115–118.
- VOLLMERHAUS B, SCHNORR B (1967) Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Lysosomen im Pansenepithel der Ziege. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* **14** (8), 761–773.
- WALGREN RA, KARNAKY JR., KARL J., LINDENMAYER GE, WALLE T (2000) Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside across human intestinal caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **294** (3), 830–836.
- WALLE T, OTAKE Y, WALLE U, WILSON FA (2000) Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *Journal of Nutrition* **130**, 2658–2661.
- WALLE U, GALIJATOVIC A, WALLE T (1999) Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line caco-2. *Biochemical Pharmacology* **58** (3), 431–438.
- WANG Y, HO C (2009) Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *Journal of agricultural and food chemistry* **57** (18), 8109–8114.
- WEIN S, BEHM N, PETERSEN RK, KRISTIANSEN K, WOLFFRAM S (2010) Quercetin enhances adiponectin secretion by a PPAR- γ independent mechanism. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **41** (1), 16–22.
- WEIN S, WOLFFRAM S (2013) Oral Bioavailability of Quercetin in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* **33** (6), 441–445.
- WICZKOWSKI W, NEMETH K, BUCINSKI A, PISKULA MK (2003) Bioavailability of quercetin from flesh scales and dry skin of onion in rats. *Polish Journal of Food and Nutrition Science* **12/53**, 95–99.
- WICZKOWSKI W, ROMASZKO J, BUCINSKI A, SZAWARA-NOWAK D, HONKE J, ZIELINSKI H, PISKULA MK (2008) Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *The Journal of Nutrition* **138**, 885–888.
- WILLIAMSON G, MANACH C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition* **81**, 243S–255S.
- WINTER J, MOORE LH, DOWELL JR. VR, BOKKENHEUSER VD (1989) C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **55** (5), 1203–1208.
- WINTER J, POPOFF MR, GRIMONT P, BOKKENHEUSER VD (1991) *Clostridium orbiscindens* sp. nov., a human intestinal bacterium capable of cleaving the flavonoid C-ring. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41** (3), 355–357.
- WISEMAN S, MULDER T, RIETVELD A (2001) Tea flavonoids: bioavailability *in vivo* and effects on cell signaling pathways *in vitro*. *Antioxidants & Redox Signaling* **3** (6), 1009–1021.

- WOLFFRAM S, BLÖCK M, ADER P (2002) Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *The Journal of Nutrition* **132**, 630–635.
- WOLFFRAM S, RAEDERSTORFF D, PRELLER M, WANG Y, TEIXEIRA SR, RIEGGER C, WEBER P (2006b) Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *The Journal of Nutrition* **136**, 2512–2518.
- WOLFFRAM S, WANG Y, THIELECKE F (2006a) Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Molecular Nutrition & Food Research* **50** (2), 176–187.
- XU C, CAI Y, MORIYA N, OGAWA M (2007) Nutritive value for ruminants of green tea grounds as a replacement of brewers' grains in totally mixed ration silage. *Animal Feed Science and Technology* **138** (3-4), 228–238.
- YAMAMOTO T, JUNEJA LR, CHU D, KIM M (1997) Chemistry and applications of green tea. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. ISBN: 0-8493-4006-3
- YOUL E, BARDY G, MAGOUS R, CROS G, SEJALON F, VIRSOLVY A, RICHARD S, QUIGNARD JF, GROSS R, PETIT P, BATAILLE D, OIRY C (2010) Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic β -cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *British Journal of Pharmacology* **161** (4), 799–814.
- ZHAI S, DAI R, FRIEDMAN FK, VESTAL RE (1998) Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metabolism and Disposition* **26** (10), 989–992.
- ZHANG Z, PENG X, LI S, ZHANG N, WANG Y, WEI H (2014) Isolation and identification of quercetin degrading bacteria from human fecal microbes. *PloS one* **9** (3), e90531.
- ZHU QY, ZHANG A, TSANG D, CHEN Z (1997) Stability of green tea catechins. *Journal of agricultural and food chemistry* **45**, 4624–4628.

Anhang A

Nachfolgend sind die in den Versuchen verwendeten Chemikalien und Geräte aufgelistet.

Chemikalien

Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
Acetonitril	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen - GER
Aluminiumnitrat	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen - GER
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt - GER
Ascorbinsäure	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen - GER
Bovines Serum Albumin	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen - GER
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt - GER
Dichlormethan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt - GER
EDTA	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen - GER
Eisentrichlorid	Merck KGaA, Darmstadt - GER
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
Essigsäureethylester	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
Heparin 25000 I.E.	Ratiopharm, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt - GER
Kolbaltdichlorid	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen - GER
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt - GER
Mangandichlorid	Merck KGaA, Darmstadt - GER
Methanol, gradient grade	J.T. Baker, Niederlande
Natriumchlorid	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt - GER
Natriumhydrogenphosphat	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen - GER
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt - GER
Natriumchloridlösung, 0,9 %	B.Braun Melsungen AG, Melsungen - GER
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt - GER

Natriumsulfat	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen - GER
Natriumsulfid	Merck KGaA, Darmstadt - GER
Resazurin	Merck KGaA, Darmstadt - GER
Trifluoressigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
β -Glucuronidase/Sulfatase	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen - GER
(+) – Catechin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
(-) – Epicatechin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
(-) – Epigallocatechin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
(-) – Epigallocatechingallat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
(-) – Gallocatechin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
Bergafat F-100	Berg + Schmidt GmbH & Co. KG, Hamburg - GER
Polyphenon 60 (Grünteeextrakt)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
Quercetindihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
Rhamnetin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
Rutinrihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe - GER
Zwiebelextrakt	Vivatis Pharma GmbH, Hamburg - GER
Zwiebelschalenextrakt	Vivatis Pharma GmbH, Hamburg - GER

Technische Geräte und Verbrauchsmaterialien

Autosampler AS-2057 Plus	JASCO Germany GmbH, Groß-Umstadt - GER
Elektrochemischer Detektor CoulArray®	ESA Inc., Chelmsford - USA
Entgaser DG-2080-54	JASCO Germany GmbH, Groß-Umstadt - GER
Fluoreszenz-Detektor FP-920	JASCO Germany GmbH, Groß-Umstadt - GER
HPLC-Pumpe PU-2080 Plus	JASCO Germany GmbH, Groß-Umstadt - GER
Säulen-Thermostat Jetstream II Plus	JASCO Germany GmbH, Groß-Umstadt - GER
Niederdruckgradienten-Mischeinheit LG-2080-04	JASCO Germany GmbH, Groß-Umstadt - GER
Trennsäule reversed-phase (C-18 Kromasil)	JASCO Germany GmbH, Groß-Umstadt - GER
Vorsäule (C-18 Inertsil)	JASCO Germany GmbH, Groß-Umstadt - GER
Säulenthhermostat co-2060 Plus	JASCO Germany GmbH, Groß-Umstadt - GER

Lithium-Heparin Monovetten	Sarstedt AG, Nümbrecht - GER
Baumwolltuch	Häberle Labortechnik GmbH & Co. KG, Lonsee-Ettlenschieß - GER
VWI-Jugularis-Katheter	C. Walter, Baruth/Mark - GER
13 mm Syringe Filter (w/0,2 µm PTFE)	VWR, West Chester, Pennsylvania - USA
IKA®Vortex Genius 3	IKA®Werke GmbH & Co. KG, Staufen - GER
Laborzentrifuge 3K12	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen - GER
Laborzentrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg - GER
Laborzentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg - GER
Magnetrührer MR 3001 K	Fa Heidolph, Schwabach - GER
pH-Meter MP 220 Inlab® 410 pH	Mettler-Toledo GmbH, Gießen - GER
Reagenzglas Rotator Modell 3025	GFL mbH, Burgwedel - GER
Savant Speed Vac® System AES 1010	Global Medical Instrumentation, USA
Ultrazentrifugalmühle ZM1	Retsch GmbH, Haan - GER
Wasserbad SW 21	Julabo GmbH, Seelbach - GER

Anhang B

Tab. B1: Zusammensetzung des Milchleistungsfutters 18/3

Rohnährstoffe [% der TS]		Futtermittel [% der TS]	
Rohprotein	18,0	Roggen	23,2
Rohfaser	7,5	Rapsextraktionsschrot (RES)	21,0
Rohasche	7,0	Maiskleberfutter	18,5
Rohfett	3,0	Gerstenfuttermehl	15,0
Calcium	0,75	Roggenkleie	12,0
Phosphor	0,65	Trockenschnitzel	4,5
Natrium	0,3	Mais	4,0
		Calciumcarbonat	1,05
Zusatzstoffe je kg Mischfutter			
Vitamin A [I.E.]	7.000		
Vitamin D3 [I.E.]	850		
Kupfer [mg]	7,5		

Angaben laut Hersteller August Plambeck GmbH & Co. KG, Brügge, Deutschland

Tab. B2: Zusammensetzung des Mineralfutters (Panto® –Mineral R62, Hamburger Leistungsfutter GmbH, Hamburg, Deutschland)

Analytische Bestandteile [% der TS]		Zusatzstoffe	
Calciumcarbonat	41,6	Vit A [I.E.]	1.000.000
Natriumchlorid	24,4	Vit D [I.E.]	100.000
Calcium-Natriumphosphat	13,9	Vit E [I.E.]	5.000
Magnesiumoxid	7,2	Kupfer [mg]	1.000
Zuckerrohrmelasse	5,0	Zink [mg]	8.000
Monocalciumphosphat	2,0	Mangan [mg]	5.000
		Jod [mg]	60
		Kobald [mg]	40
		Selen [mg]	50

I.E. = Internationale Einheiten

Tab. B3: Zusammensetzung des Inkubationsmediums im Hohenheimer Futterwerttest

Reagenzien	Konzentration Stammlösung [mmol/l]	Volumen [ml/l Inokulum]
H ₂ O	-	316
Mineralstofflösung:		
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	898	0,08
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	505	
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	42	
FeCl ₃ × 6 H ₂ O	296	
Pufferlösung:		
NaHCO ₃	417	158
(NH ₄)HCO ₃	50,6	
Mengenelementlösung:		
Na ₂ HPO ₄	40,2	158
KH ₂ PO ₄	45,6	
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	2,4	
Resazurinlösung	0,4	0,81
Pansensaft	-	334
Reduktionslösung:		
H ₂ O	-	31,7
NaOH	1.000	1,3
Na ₂ S	73,8	-

Alle Lösungen wurden mit destilliertem Wasser angesetzt

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Siegfried Wolffram bedanken, der mir erst die Promotion in diesem Rahmen ermöglichte. Er war stets am Fortgang der Arbeit interessiert, ein guter Ansprechpartner in allen fachlichen Fragen und hat mich nach Kräften gefördert.

Ich bedanke mich auch bei Maike und Petra für die Einarbeitung in die HPLC-analytik sowie die Unterstützung bei sämtlichen Laborarbeiten, sowie bei Wiebke, Anette, Jessi und Moni für die Durchführung der Futtermittelanalytik. An dieser Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei allen, die mich tatkräftig bei meinen Tierversuchen unterstützt haben (Silvia, Dr. Volker Otten, Tierpfleger Torben und Stefan, Anika, Simon, Faraz, Christian, Laura, Maike, Wiebke).

Ich bedanke mich bei meinen Kondoktoranden, sowie Silvia und Anita für die vielen Gespräche, fachlicher und privater Natur, sowie allen, die dazu beigetragen haben, dass ich mich am Institut sehr wohl gefühlt habe. Anika und Iris danke ich ganz herzlich für ihre wunderbare Unterstützung auf den letzten Metern der Abgabe meiner Doktorarbeit, sowie Heimke und Katinka für ihre seelische Unterstützung im Rahmen des Peer-coachings.

Ich bedanke mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Stefan, einem ganz besonderen Menschen in meinem Leben. Ohne seine seelische, familiäre und finanzielle Unterstützung, wäre mir weder mein Studium noch meine Promotion möglich gewesen.

Mein ganz besonderer Dank gilt den wichtigsten Menschen in meinem Leben: meinen Kindern Hannah und Ole, die mir während meiner Promotionszeit immer wieder gezeigt haben, worauf es im Leben ankommt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Birgit Beyer (geb. Mattusch)
Anschrift: Franckestr. 5
24118 Kiel
Geburtsdatum/-ort: 22.02.1982/Schwerin
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder: Jan-Ole (* 25.08.2006), Hannah (* 31.03.2008)

Schulausbildung

09/95 – 08/00 Gymnasium Calbe/Saale
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Ausbildung

08/01 – 08/03 **Ausbildung zur Landwirtin** in Niedersachsen

Hochschulausbildung

10/03 – 03/08 **Studium der Agrarwissenschaften** an der **Hochschule Anhalt (FH) Abteilung Bernburg**
Thema der Diplomarbeit: „Wechselwirkungen zwischen dem Leistungsniveau, der Fruchtbarkeit und dem Krankheitsgeschehen bei Milchkühen der Rasse Holstein Friesian“
Erlangung der Ausbildereignung nach AEVO
Abschluss: Diplom-Ingenieurin (FH)

04/09 – 09/11 **Studium der Agrarwissenschaften** an der **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**
Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, Studiengang: Milcherzeugung
Thema der Masterarbeit: „Einfluss verschiedener pflanzlicher Futtermittelzusätze auf ruminale Fermentationsprozesse *in vitro*“
Abschluss: Master of Science (M.Sc.) Agrarwissenschaften

10/11 – 07/15 **Promotion** an der **Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**
Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät, Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie

Berufstätigkeit

01/12 – 02/15 **wissenschaftliche Mitarbeiterin** am Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Praktika

09/00 – 07/01 **Freiwilliges Ökologisches Jahr** auf dem Ziegenhof in Glinde/Elbe von G. Kutschbach

04/05 – 07/05 **Praktikum am Dairy Education and Research Centre Agassiz, B.C., Canada**, Projektthema: „Auswirkungen von Leinsaat in der TMR auf die Follikelentwicklung im Uterus bei Milchkühen“

08/05 – 09/05 **Praktikum** auf dem Ackerbaubetrieb von Stefan Beyer; 185 ha Marktfrüchte, Sonderkulturen Spargel und Blumen